



Universitat Autònoma  
de Barcelona

**Estudio cuantitativo y composicional sobre  
biofilms monoespecie de microorganismos  
alterantes para la industria cárnica e  
interacción en el desarrollo de biofilms  
multiespecie**

**Nerea García Hernández**



Universitat Autònoma  
de Barcelona



ESTUDIO CUANTITATIVO Y COMPOSICIONAL SOBRE BIOFILMS  
MONOESPECIE DE MICROORGANISMOS ALTERANTES PARA LA  
INDUSTRIA CÁRNICA E INTERACCIÓN EN EL DESARROLLO DE  
BIOFILMS MULTIESPECIE

**Nerea García Hernández**

Trabajo presentado para la superación de los 15 créditos del Módulo Trabajo Fin de Máster  
del Máster Oficial en Calidad de Alimentos de Origen Animal

Trabajo dirigido por:

**Dr. José Juan Rodríguez Jerez**  
**Dra. Carolina Ripollés Ávila**

Facultat de Veterinària

Departament de Ciència Animal i dels Aliments

Barcelona, Septiembre de 2019

**Departament de Ciència Animal i dels Aliments**

José Juan Rodríguez Jerez, Profesor Titular del Área de Nutrición y Bromatología, y  
Carolina Ripollés Ávila, Profesora Asociada del Área de Nutrición y Bromatología, del  
Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Universitat Autònoma de Barcelona

**CERTIFICAN,**

Que el trabajo de investigación titulado: *“Estudio cuantitativo y composicional sobre biofilms mono especie de microorganismos alterantes para la industria cárnica e interacción en el desarrollo de biofilms multiespecie”* ha sido realizado bajo nuestra dirección por la **Sra. Nerea García Hernández**, dentro del módulo “Trabajo Fin de Máster” del Máster Oficial de Calidad de Alimentos de Origen Animal de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Y para que conste donde proceda, firmo el presente en Bellaterra (Cerdanyola del Vallés) a  
3 de septiembre de 2019.



Dr. José Juan Rodríguez Jerez  
Profesor Titular

JOSE JUAN RODRIGUEZ JEREZ - DNI 25979547N  
Firmado digitalmente por JOSE JUAN RODRIGUEZ JEREZ - DNI 25979547N  
Fecha: 2019.09.03 00:36:02 +02'00'

CAROLINA RIPOLLÉS ÁVILA  
Firmado digitalmente por CAROLINA RIPOLLÉS ÁVILA  
Fecha: 2019.09.03 13:36:56 +02'00'

Dra. Carolina Ripollés Ávila  
Profesora Asociada



Nerea García Hernández  
Alumna Máster Calidad de los  
Alimentos de Origen Animal

## **Agradecimientos**

En primer lugar, quiero agradecerle al Dr. Jose Juan Rodriguez Jerez el haberme dado la oportunidad de participar en su grupo de investigación, sin la cual nada de esto hubiera sido posible.

A la Dra. Carolina Ripolles Avila por su apoyo y sus consejos en la elaboración de este trabajo, sin duda ha sido fundamental. He de agradecerle especialmente todo lo que me ha enseñado en este tiempo.

A Brayan, por su paciencia infinita aun en los momentos de mayor estrés, por ser uno de los mejores profesores que he tenido, a la vez que compañero.

A Dolors, por no haberme matado en estos meses por mis despistes, pero sobre todo por su ayuda y disposición constantes.

Al resto del departamento de Higiene de los alimentos, por acogerme como una más entre ellos.

A mis padres y mi hermano, por su apoyo absoluto y por estar siempre ahí.

A Hichem, mi apoyo, mi fuerza, mi amor, por ser la fuerza que me permite seguir adelante, por no permitirme rendirme, por creer en mí de manera incondicional, pero sobre todo por existir en mi vida.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**ADNe:** ADN extracelular

**AESAN:** “Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición”

**CECT:** “Colección Española de Cultivos Tipo”

**DEM:** “Microscopía de Epifluorescencia Directa”

**EPS:** “Sustancias Poliméricas Extracelulares”

**FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

**MRS:** “Man, Rogosa y Sharpe”

**P:** “valor p”

**TSA:** “Agar de Soja y Triptona”

**TSB:** “Caldo de Soja y Triptona”

**UFC:** Unidades Formadoras de Colonias

## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN/ ABSTRACT .....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Calidad en la industria alimentaria y relación con microorganismos alterantes .....</b>	<b>4</b>
<b>2.2. Desarrollo y formación de biofilms .....</b>	<b>6</b>
<b>2.2.1. Matriz extracelular de protección .....</b>	<b>7</b>
<b>2.2.2. Mecanismos de resistencia de los biofilms.....</b>	<b>8</b>
<b>2.3. Biofilms en la industria alimentaria .....</b>	<b>9</b>
<b>2.3.1. Biofilms en la industria cárnica .....</b>	<b>10</b>
<b>2.4. Objetivos .....</b>	<b>11</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>12</b>
<b>3.1. Superficies bajo estudio .....</b>	<b>12</b>
<b>3.2. Cepas microbianas .....</b>	<b>12</b>
<b>3.3. Recuperación de cultivos liofilizados .....</b>	<b>13</b>
<b>3.4. Biofilms monoespecie .....</b>	<b>13</b>
<b>3.4.1. Preparación del inóculo .....</b>	<b>13</b>

3.4.2. Formación del biofilm mono especie .....	13
3.4.3. Evaluación por Microscopía de Epifluorescencia Directa (DEM) .....	14
3.5. Preimplantación de <i>Leuconostoc gasicomitatum</i> en superficies de acero inoxidable y efecto sobre la posterior colonización por <i>Pseudomonas fragi</i> y <i>Lactobacillus reuteri</i> .....	16
3.5.1. Preparación del inóculo.....	16
3.5.2. Preimplantación de <i>L. gasicomitatum</i> y posterior colonización.....	16
3.5.3. Evaluación de los biofilms multiespecie mediante recuento en placa .....	17
3.6. Análisis estadístico .....	17
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>18</b>
4.1. Evaluación de células viables y no viables de los biofilms mono especie .....	18
4.2. Evaluación de la composición de la matriz de los biofilms mono especie .....	23
4.3. Evaluación del recuento en placa de los biofilms multiespecie .....	27
<b>5. CONSLUSIONES .....</b>	<b>31</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>32</b>

## **LISTA DE TABLAS**

<b>Tabla 1.</b> Recuento total y porcentaje de supervivencia de las células que conformaron a los biofilms generados por las diferentes especies bacterianas .....	19
--	----



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Fases para la formación de un biofilm .....	6
<b>Figura 2.</b> Matriz extracelular de sustancias poliméricas .....	8
<b>Figura 3.</b> Cuatro posibles mecanismos de resistencia bacteriana en biofilms formados sobre una superficie .....	9
<b>Figura 4.</b> Imágenes obtenidas mediante DEM para el recuento de células viables y no viables de <i>P. fragi</i> mediante tinción Live/Dead .....	21
<b>Figura 5.</b> Imágenes obtenidas mediante DEM para el recuento de células viables y no viables de <i>L. reuteri</i> mediante tinción Live/Dead .....	22
<b>Figura 6.</b> Imágenes obtenidas mediante DEM para el recuento de células viables y no viables de <i>L. gasicomitatum</i> mediante tinción Live/Dead .....	22
<b>Figura 7.</b> Representación de los porcentajes en macronutrientes que conforman la matriz de los biofilms de las diferentes especies bacterianas: (A) proteínas; (B) polímeros; (C) ADN .....	25
<b>Figura 8.</b> Imágenes obtenidas mediante DEM para la cuantificación de macromoléculas (proteínas, polímeros y ADN). (a y b): <i>P. fragi</i> ; (c y d): <i>L. reuteri</i> ; (e y f): <i>L. gasicomitatum</i> .....	27
<b>Figura 9.</b> Representación del recuento en placa de colonias a las 24, 48 y 72 horas de células recuperadas de biofilms multiespecie de <i>L. gasicomitatum</i> y <i>P. fragi</i> .....	29
<b>Figura 10.</b> Representación del recuento en placa de colonias a las 24, 48 y 72 horas de células recuperadas de biofilms multiespecie de <i>L. gasicomitatum</i> y <i>L. reuteri</i> .....	30

## 1. RESUMEN

La alteración de los alimentos constituye un grave problema económico para la industria alimentaria, generando pérdidas importantes. Un alimento alterado no necesariamente tiene que suponer un riesgo para la salud pública, pero carece de la calidad que los consumidores esperan de él. Una de las principales causas de estas alteraciones es la contaminación con microorganismos que persisten en la industria en forma de biofilms, lo cual dificulta su control. En el estudio que se presenta a continuación, se utilizaron tres especies distintas de microorganismos alterantes: *Pseudomonas fragi*, *Leuconostoc gasicomitatum* y *Lactobacillus reuteri*, todos ellos presentes en la carne y tracto gastrointestinal del pollo. El estudio consistió en determinar su capacidad de formación de biofilms mono especie así como la interacción que tienen cuando éstos se encuentran en convivencia. De este modo, se utilizaron las tres especies para investigar la formación de biofilms simples maduros en una semana a una temperatura de 30°C. *L. gasicomitatum* se utilizó también para investigar el comportamiento de *P. fragi* y *L. reuteri* en la formación de biofilms multiespecie sobre superficies de acero inoxidable. La evaluación de la estructura y composición de los biofilms mono especie se realizó mediante microscopía de epifluorescencia directa (DEM). En el caso de los biofilms multiespecie, el crecimiento se determinó por recuento de colonias en placa. Los resultados demostraron que tanto *L. gasicomitatum* como *L. reuteri* fueron capaces de formar biofilms, obteniendo recuentos aproximadamente de 7 Log UFC/cm<sup>2</sup> y estructuras definidas. Contrariamente, *P. fragi* obtuvo recuentos del orden de 4 Log UFC/cm<sup>2</sup>, significativamente diferentes a las especies anteriores ( $P < 0.05$ ), y no presentó una red de conglomerados celulares típico en biofilms. En relación a las macromoléculas que conformaron la matriz, se obtuvo entre 70 – 80 % de contenido proteico para los biofilms de *L. gasicomitatum* y *L. reuteri*, a diferencia de *P. fragi* que presentó un mayor contenido polisacárido ( $P < 0.05$ ). Los resultados de los biofilms multiespecie demostraron que la presencia de *P. fragi* no afectó al crecimiento de *L. gasicomitatum*, el cual mantiene su crecimiento de entre 5,76 a 6,1 Log UFC/cm<sup>2</sup>. Sin embargo, *L. reuteri* podría ejercer un desplazamiento de *L. gasicomitatum* tras 24 horas en convivencia como biofilm mixto, al presentar una diferencia en el recuento de aproximadamente 2 Log UFC/cm<sup>2</sup>. El estudio de biofilms, tanto mono especie como multiespecie, son de interés pues ayuda comprender las relaciones en ecología microbiana y a buscar nuevas tecnologías para su eliminación.

Palabras clave: Microbiota alterante, biofilm, interacciones, multiespecie, control, acero inoxidable

## 1. ABSTRACT

The alteration of food represent a serious economic problem in food industry, creating significant losses. An altered food does not necessarily have to pose a risk to public health, but it lacks the quality that consumers expect from it. One of the main causes of these alterations is the contamination with microorganisms that persist in the industry in the form of biofilms, which makes their control difficult. In the study presented below, three different species of alternating microorganisms were used: *Pseudomonas fragi*, *Leuconostoc gasicomitatum* and *Lactobacillus reuteri*, which can be found in the meat and gastrointestinal tract of the chicken. The main aim of this study was to determine their ability to form monospecies biofilms as well as the interaction they have when they coexist with one another. Thus, the three species were used to investigate the formation of mature simple biofilms in a week at a temperature of 30 ° C. *L. gasicomitatum* was also used to investigate the behavior of *P. fragi* and *L. reuteri* in the formation of multispecies biofilms on stainless steel surfaces. The evaluation of the structure and composition of the monospecies biofilms was performed by direct epifluorescence microscopy (DEM). In the case of multispecies biofilms, growth was determined by plate colony count. The results showed that both *L. gasicomitatum* and *L. reuteri* were able to form biofilms, obtaining counts of approximately 7 Log CFU / cm<sup>2</sup> and defined structures. On the contrary, *P. fragi* obtained counts of the order of 4 Log CFU / cm<sup>2</sup>, significantly different from the previous species ( $P < 0.05$ ), and did not present a network of typical cell clusters in biofilms. In relation to the macromolecules that formed the matrix, between 70-80% protein content was obtained for the biofilms of *L. gasicomitatum* and *L. reuteri*, unlike *P. fragi* that presented a higher polysaccharide content ( $P < 0.05$ ). The results of the multispecies biofilms showed that the presence of *P. fragi* did not affect the growth of *L. gasicomitatum*, which maintains its growth between 5.76 to 6.1 Log CFU / cm<sup>2</sup>. However, *L. reuteri* could exert a displacement of *L. gasicomitatum* after 24 hours in coexistence as a mixed biofilm, presenting a difference in the count of approximately 2 Log CFU / cm<sup>2</sup>. The study of biofilms, both monospecies and multispecies, are of interest because it helps to understand the relationships in microbial ecology and to look for new technologies for their elimination.

Keywords: Alternating microorganism, biofilm, interactions, multispecies, control, stainless steel

## 2. INTRODUCCIÓN

La capacidad de los microorganismos para adherirse a las superficies industriales y posteriormente iniciar la formación de biofilms tiene importantes repercusiones para la industria alimentaria, en especial por sus consecuencias, tanto a nivel de seguridad como calidad de los alimentos (Khelissa et al., 2017; Ripolles-Avila, 2018). Los biofilms se definen como ecosistemas microbiológicos complejos formados, generalmente, por múltiples especies asociadas entre ellas y embebidas por una matriz protectora constituida por polisacáridos, proteínas y ADN extracelular (ADNe) (Ripolles-Avila, 2018; Desmond, 2018). Esta asociación microbiana es una forma de protección frente a condiciones ambientales hostiles así como también otra forma de promover las relaciones simbióticas entre especies (Kretli et. al., 2015; Percival et. al. 2015; Costerton et. al., 1999; Flemming et. al., 2016), lo que favorece su persistencia, pudiendo dar lugar a contaminaciones recurrentes. En la industria alimentaria, su presencia se considera perjudicial e indeseable puesto que aumenta el riesgo de contaminación cruzada de estos microorganismos a los alimentos (Kusumaningrum et. al., 2003) lo que se traduce en una disminución de la vida útil, pérdida de calidad del producto o incluso en la transmisión de enfermedades en el caso de presencia de microorganismos patógenos.

Desde un punto de vista tecnológico, los biofilms también pueden ocasionar pérdidas económicas debido a que pueden producir una reducción del flujo de líquidos, reducción de la transmisión del calor, pérdidas energéticas, bloqueo de los poros de membranas y la corrosión de metales (AESAN, 2010). Por ello, la limpieza y desinfección se convierte en un punto clave para el control de estas estructuras dentro de la industria alimentaria. Generalmente, los productos empleados para la desinfección en la industria alimentaria no penetran en la matriz de los biofilms por lo que los microorganismos quedan protegidos por esta estructura y no son eliminados. Es por esta razón que acaban presentando resistencias a este tipo de productos como son los desinfectantes o los antibióticos, y es tan costosa su eliminación (Simões et. al., 2010). Por ello, se deben tener cada vez más presentes las estrategias alternativas para su control en industria alimentaria, como son el uso de bacteriófagos (Gutierrez et. al., 2016), inhibidores del quorum sensing (Oh et al., 2017), aceites esenciales (Kang et al. 2018) o el biocontrol por competencia de microbiota propia de las instalaciones (Ripolles-Avila et. al., 2019).

## 2.1. Calidad en la industria alimentaria y relación con microorganismos alterantes

Calidad alimentaria es el “conjunto de propiedades y características de un producto alimenticio relativas a las materias primas o ingredientes utilizados en su elaboración, a su naturaleza, composición, pureza, identificación, origen, y trazabilidad, así como a los procesos de elaboración, almacenamiento, envasado y comercialización utilizados, y a la presentación del producto final, incluyendo su contenido efectivo y la información al consumidor final especialmente etiquetado”. Ésta es la definición de calidad alimentaria que ofrece la Ley 28/2015, del 30 de julio, para la defensa de la calidad alimentaria. No obstante, es una enumeración legislativa de las cualidades de un producto alimenticio que responde a una necesidad de medir, desde un punto de vista técnico, la calidad de un producto y así poder compararlo con otro. A esto se le puede considerar un concepto de calidad objetiva de los alimentos. Sin embargo, existe otro concepto de calidad, la denominada como calidad percibida por el consumidor o “la opinión del consumidor sobre la superioridad o excelencia de un producto” (Zeithaml, 1988). Actualmente, casi todos los países industrializados cuentan con buenos sistemas para garantizar un grado razonable de calidad e inocuidad de los alimentos que se consumen. Cada vez aumenta más la preocupación por lo que se consume y para que un sistema alimentario funcione de forma efectiva, se requiere de una implicación sobre la calidad e inocuidad de los alimentos realizándose acciones para garantizarlas (FAO, 2002).

La calidad de los alimentos puede verse afectada por diversos factores, destacando entre ellos la presencia de determinados microorganismos alterantes. Las materias primas empleadas en la elaboración de productos alimentarios contienen su propia microbiota y, además, durante el procesado y distribución de los mismos, éstos pueden contaminarse, aumentando de este modo su microbiota intrínseca. Su composición química y las condiciones en las que se encuentren pueden favorecer el crecimiento y predominio de determinados microorganismos y producir una alteración alimentaria. En general, cuanto mayor sea la carga bacteriana inicial del alimento, más breve será su vida útil debido al aumento de las actividades microbianas. La alteración no sólo se debe al crecimiento microbiano visible sino también a la producción de metabolitos finales que originan olores, colores y/o malos sabores, gas, limosidad o pérdida de la textura normal. Obviamente, los signos de alteración varían notablemente dependiendo de los alimentos, su carga microbiana y las condiciones ambientales (Gomez, 2010; Nerin et. al., 2016; Doulgeraki et al. 2012). Entre las bacterias alterantes Gram-negativas destacan diversas especies de los géneros *Pseudomonas* spp. *Alteromonas* spp., *Shewella* spp. y *Aeromonas* spp. (Gomez, 2010;

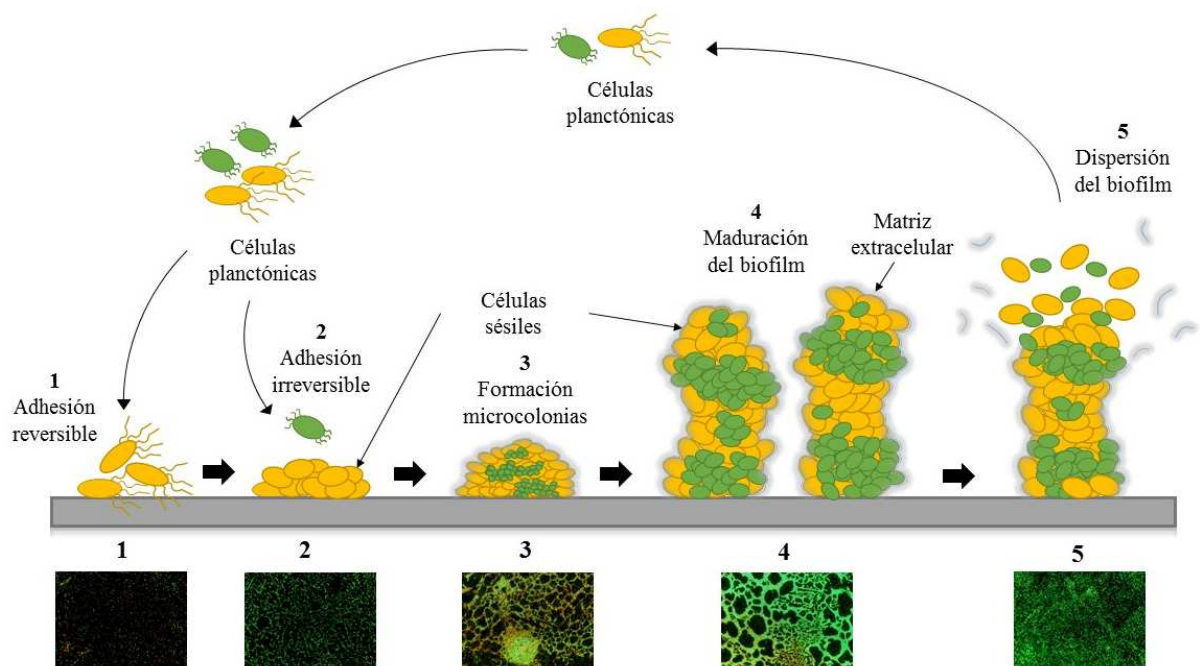
Jiménez-Cantero et al. 2019, Casaburi et al., 2014; Moretro y Langsrud, 2017) Durante el almacenamiento en frío, pueden alterar todos aquellos alimentos caracterizados por tener una alta actividad de agua y un pH cercano a la neutralidad (leche y productos lácteos, carnes, pescados, mariscos, huevos, entre otros). Muchos de estos microorganismos producen proteasas y lipasas termoestables y, en consecuencia, son capaces de producir malos olores y sabores incluso cuando las células vegetativas han sido destruidas mediante un tratamiento térmico (Gomez, 2010). Respecto a las bacterias Gram-positivas no esporuladas, destacan las bacterias del ácido láctico (*Pediococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Lactobacillus* spp., y *Enterococcus* spp.), las acetobacterias (*Acetobacter* spp.) y *Brochothrix thermosphacta* (Gomez, 2010, Jiménez-Cantero et al. 2019; Casaburi et al. 2014; Moretro y Langsrud, 2017). Muchas de ellas son muy importantes en la industria alimentaria por formar parte de los cultivos iniciadores. Sin embargo, también existen diversas cepas capaces de alterar los alimentos fermentados o aquellos envasado en atmósferas modificadas o al vacío (Casaburi et al., 2014). La causa de la alteración suele ser la producción de dióxido de carbono, un exceso de acidificación debido a la producción de ácido láctico, la generación de exopolisacáridos que originan mucosidad, viscosidad o filamentosidad (Gomez, 2010). Entre los microorganismos alterantes Gram-positivos y esporulados existen diversas especies de *Bacillus* spp. *Clostridium* spp. que se comportan como agentes alterantes de los alimentos procesados térmicamente, ya que las esporas sobreviven a estos tratamientos. Por ejemplo, *Bacillus cereus* puede crecer en la leche pasteurizada, almacenada a 5°C y producir una coagulación sin acidificación, *Bacillus stearothermophilus* puede dar lugar a una acidificación de los alimentos enlatados produciendo ácido para desarrollarse, pero sin producir gas, por lo que la lata no se abomba, sin embargo, *Clostridium thermosaccharolyticum* genera gas y altera los alimentos enlatados, por lo que se puede apreciar un abombamiento del envase. Por otro lado, *Desulphotomaculum nigrificans* es responsable de la alteración que produce un olor sulfuroso debido a la producción de sulfuro de hidrógeno y al consiguiente abombamiento y mal olor; *Clostridium tyrobutyricum* y *Clostridium butyricum* causan el hinchamiento tardío en quesos, que se caracteriza por la formación de ácido butírico que conduce a la formación de gases y olores anómalos (Gomez, 2010, Jiménez-Cantero et al., 2019). Por lo tanto, el control de los microorganismos alterantes en la industria alimentaria también es de importancia ya que su presencia puede conllevar a una evidente pérdida en la calidad y, por consecuencia, a un impacto económico alto.

## 2.2. Desarrollo y formación de biofilms

Los biofilms son comunidades complejas de microorganismos que crecen bajo una matriz orgánica polimérica autoproducida y adherida a una superficie biótica o abiótica, y que pueden presentar una única especie microbiana o diferentes especies (Ripolles-Avila et. al., 2018). Las bacterias que forman estas estructuras se hallan en forma sésil, presentando un fenotipo diferente al de estas mismas células en forma unicelular o libre, estado que se denomina planctónico. A lo largo del tiempo, se ha demostrado que el estado sésil constituye una forma adaptativa y de persistencia de los microorganismos, siendo la forma en la que se encuentran la mayor parte de microorganismos (González-Rivas et al. 2018).

Para la formación de un biofilm solo se requiere de un medio hidratado y una mínima cantidad de nutrientes. Este proceso de formación es dinámico y complejo, conllevando desde la adhesión, hasta la colonización y el crecimiento de los microorganismos en la superficie (Téllez, 2010). Este proceso consta de cinco fases diferentes (Figura 1):

1. Adsorción del microorganismo en estado planctónico a la superficie.
2. Unión irreversible mediante la producción de una matriz polimérica.
3. División de microorganismos para la formación de microcolonias.
4. Maduración de la estructura mediante la producción de una matriz robusta protectora.
5. Dispersión de células colonizadoras.



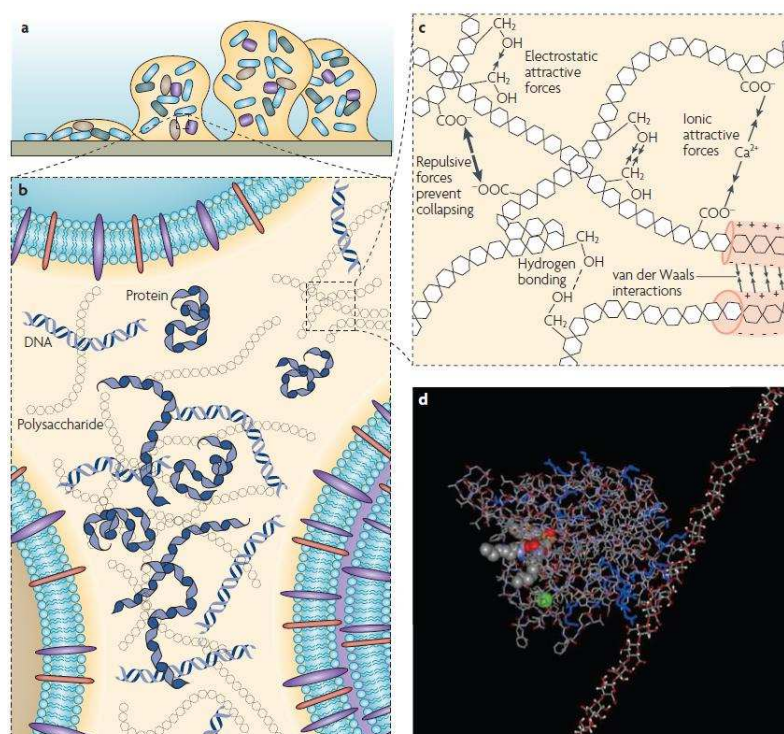
**Figura 1.** Fases para la formación de un biofilm. Obtenido de (Ripolles-Avila, (2018)

### 2.2.1. Matriz extracelular de protección

En la mayoría de los biofilms, el recuento de microorganismos representa menos del 10 %, mientras que la matriz puede representar más del 90 % (Flemming et. al., 2010, Wingender, et al, 1999)). La matriz es el material extracelular producido principalmente por los mismos microorganismos que conforman la estructura. Consiste en un conglomerado de diferentes tipos de biopolímeros, conocidos como sustancias poliméricas extracelulares (EPS), que forman el soporte para la arquitectura tridimensional del biofilm y que son los responsables de la adherencia a las superficies y de la cohesión en la comunidad microbiana (Flemming et. al., 2010). La matriz del biofilm retiene a las células y las mantiene próximas entre sí, permitiendo un elevado grado de interacción, incluida la comunicación intercelular y la formación de microconsorcios sinérgicos (Flemming et. al., 2010, Karatan et al., 2009)). La matriz protege además a los microorganismos frente a la desecación, agentes oxidantes, biocidas, algunos antibióticos y cationes metálicos, radiación ultravioleta y defensas inmunes. Sin embargo, las células del biofilm no están completamente inmovilizadas, sino que pueden moverse en el interior del biofilm y desprenderse del mismo (Flemming et. al., 2010). De entre todos los componentes que conforman la matriz extracelular de estas estructuras se encuentran, principalmente, los polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos (**Figura 2**) (Flemming et. al., 2010; Sutherland, 2001; Chmielewski et. al., 2003).

Los polisacáridos constituyen parte de la matriz extracelular y cumplen diversas funciones esenciales para la formación de los biofilms, generalmente asociadas a la adhesión a superficies y al mantenimiento de la integridad estructural (Wingender et. al., 2001; Ryder et. al. 2007). Por otra parte, las proteínas presentes en la matriz extracelular poseen funciones que permiten el crecimiento del biofilm y la supervivencia de las células alojadas mediante el acceso a nutrientes o la regulación de la integridad y la estabilidad del biofilms. Las proteínas están implicadas en la formación y estabilización de la red de polisacáridos de la matriz y constituyen un enlace entre la superficie bacteriana y los componentes más glucídicos (Busalmen et al. 2002; Lasa et al. 2006). Finalmente, el ADNe constituye también una parte integral de la matriz del biofilm. Actúa como conector intercelular, como adhesivo a la superficie o incluso como antimicrobiano, causando la lisis celular mediante la quelación de cationes que estabilizan lipopolisacáridos y la membrana externa bacteriana (Wingender et al. 1999; Whitchurch et. al. 2002). La composición en macromoléculas que tienen estas estructuras es de real importancia, pues dependerá del tipo de microbiota, y por tanto, para realmente poder eliminar a los biofilms, es necesario saber la composición que tienen para adaptar estrategias alternativas de limpieza.



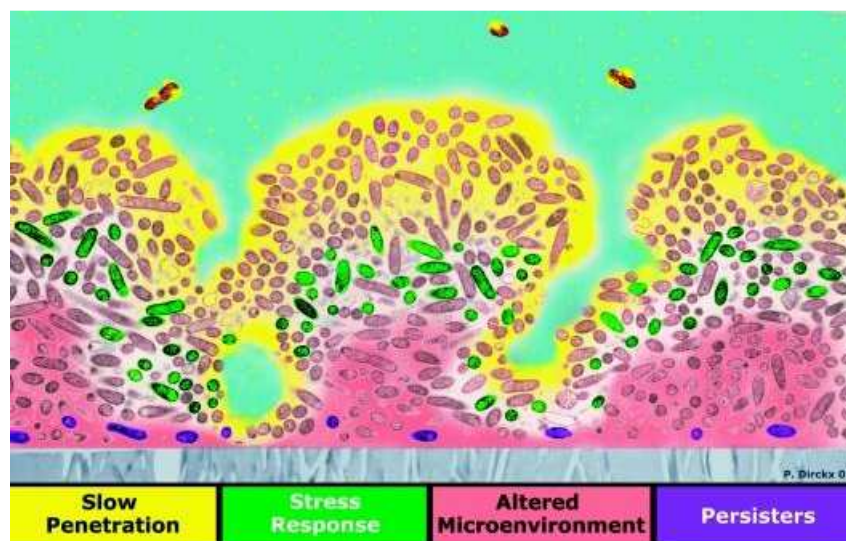


**Figura 2.** Matriz extracelular de sustancias poliméricas. (a)- Modelo de un biofilm bacteriano unido a una superficie sólida: (b)- Los componentes principales de la matriz (polisacáridos, proteínas y ADN) se distribuyen entre las células en un patrón no homogéneo estableciendo diferencias entre regiones de la matriz: (c)- Las interacciones fisicoquímicas débiles y el entrelazamiento de biopolímeros proporcionan estabilidad a la matriz: (d)- Simulación de un modelo molecular de la interacción entre el alginato de exopolisacárido (derecha) y la enzima extracelular lipasa (izquierda) (Flemming y Wingender, 2010)

### 2.2.2. Mecanismos de resistencia de los biofilms

La relativa resistencia que adquieren las células que conforman los biofilms tiene un alto impacto económico y ambiental (Huang et. al. 1995). Éstas presentan una mayor resistencia a los tratamientos con antimicrobianos que las células individuales en suspensión (Kumar et. al., 1998). Esta resistencia se ha observado ampliamente y se atribuye a las propiedades asociadas con el biofilm, que incluyen la difusión reducida, los cambios fisiológicos debido a las tasas de crecimiento reducidas y la producción de enzimas que degradan las sustancias antimicrobianas (Kumar et. al., 1998). Es difícil establecer un solo mecanismo como causa de la resistencia, de hecho, ésta viene dada por una combinación de muchos de ellos. Hay estudios en los que se ha observado que desinfectantes como el ácido peracético, el cloruro mercurico y el formaldehído no han demostrado tener ningún efecto sobre determinados microorganismos cuando éstos se encuentran en forma de biofilms. La explicación respecto a la reducción de la eficacia de dichos agentes contra estas comunidades es la penetración incompleta de los biocidas a través de la matriz (Kumar et. al., 1998). En este sentido, Chambless et. al., (2006)

proponen cuatro posibles mecanismos de resistencia a antibióticos por parte de las células presentes en los biofilms (**Figura 3**).



**Figura 3.** Cuatro posibles mecanismos de resistencia bacteriana en biofilms formados sobre una superficie (en gris). (a) Dificultar la penetración de biocidas en zonas externas del biofilm (en amarillo); (b) Generar una respuesta al estrés por parte de algunas bacterias (en verde); (c) Alterar el medioambiente del biofilm como respuesta (zona rosa); y (d) bacterias resistentes por diferenciación fenotípica (en morado) (Chambless et. al., 2006).

### 2.3. Biofilms en la industria alimentaria

La formación de biofilms en ambientes de procesamiento de alimentos es de especial importancia, ya que pueden actuar como fuentes persistentes de contaminación microbiana, conllevando una alteración del alimento y/o a la transmisión de enfermedades (González-Rivas et al., 2018). Se ha observado el crecimiento de los mismos en superficies tales como plásticos, acero inoxidable, caucho, vidrio, polipropileno y madera (Téllez, 2010; Dominguez Rodriguez, L. et al., 2010). Desde un punto de vista tecnológico, la formación de biofilms en los equipos industriales puede liderar serios problemas de higiene y pérdidas económicas, ya que, por ejemplo en la industria láctea, los microorganismos presentes en estas estructuras pueden llegar a catalizar reacciones químicas y biológicas, causando corrosión en las tuberías y en los tanques de almacenamiento. Al mismo tiempo pueden reducir la eficacia de transferencia de calor y aumentar la resistencia en los fluidos. Los biofilms pueden ocasionar reducción del flujo de líquidos, reducción de la transmisión del calor, pérdidas energéticas, bloqueo de los poros de membranas y la corrosión de metales (Álvarez-Gurrea, 2015).

### 2.3.1. Biofilms en la industria cárnica

La contaminación de la carne y productos cárnicos en la industria alimentaria puede ocurrir en cualquier punto, desde el sacrificio hasta el embalaje. Se ha reportado que las células presentes en las superficies industriales formando biofilms podrían interactuar con proteínas (fibronectina, laminina y colágeno) de la carne y adherirse a su superficie (Navia et. al., 2010). Los residuos orgánicos derivados de la propia la industria cárnica suponen un nicho para la acumulación de microorganismos y la consecuente formación de biofilms convirtiéndose en una fuente de contaminación cruzada (Srey et. al., 2012; Ripolles-Avila, et al. 2019).

La carne proporciona un buen sustrato para el crecimiento de microorganismos, tanto alterantes como patógenos, ya que posee una elevada actividad de agua (0,99), es rica en proteínas, lípidos, diversos componentes solubles de bajo peso molecular, vitaminas y minerales y contiene una pequeña concentración de carbohidratos (0-1,2 %) (Gomez, 2010). Además, la carne es susceptible de contaminaciones cruzadas durante las operaciones de sacrificio, carnización, procesado y almacenamiento (Gomez, 2010; Wang et al., 2017; Jiménez-Cantero et al., 2019). Los microorganismos psicrótrofos producen la alteración de las canales en condiciones de refrigeración (Gomez, 2010). Entre la microbiota alterativa destacan los bacilos aerobios Gram-negativos pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* spp., que representan más del 50 % de la microbiota alterante, destacando especies tales como *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas lundensis* y *Pseudomonas fluorescens*. De entre ellas cabe destacar que *P. fragi* es una de las mayores productoras de ésteres etílicos, dando lugar a un olor afrutado dulce característico de la fase inicial de deterioro (Gomez, 2010). Ésta, junto con otras especies pertenecientes al género *Pseudomonas* spp., también producen putrescina a partir de la arginina y una serie de compuestos azufrados responsables de los olores pútridos de la fase avanzada de alteración (Gomez, 2010; Casaburi et al. 2014) En la carne envasada al vacío, la atmósfera que se genera inhibe el crecimiento de la microbiota aerobia Gram-negativa y favorece el predominio de ciertas bacterias del ácido láctico, fundamentalmente de los géneros *Lactobacillus* spp. y *Leuconostoc* spp. (Gomez, 2010,). El desarrollo de estas bacterias da lugar a una amplia variedad de productos finales de su metabolismo y origina la pérdida de sus propiedades organolépticas (Jiménez-Cantero et al., 2019; Casaburi et al., 2014). Por ejemplo, el ácido sulfhídrico formado reacciona con la oximioglobina para originar

sulfohemoglobina, sustancia responsable del enverdecimiento de estos alimentos (Gomez, 2010). La microbiota activa de las aves procesadas está compuesta de muchos tipos de bacterias y levaduras. Algunos de estos microorganismos son parte de la microbiota de las aves de corral vivas y llegan a las instalaciones de procesado en el cuerpo y en el tracto intestinal de las aves. Otros microorganismos encontrados en la carne pueden haber llegado por contaminación cruzada de otros animales, agua, equipos o personal de la planta procesadora (Jimenez-Cantero, 2012). Es este aspecto de especial interés *L. gasicomitatum*, debido a que se ha aislado repetidamente en industria cárnica (Hascöet, 2019), también se han realizado estudios para la determinación de bacterias del ácido láctico en tracto intestinal del pollo concluyendo que *L. reuteri* es la más abundante entre ellas (Wang et al. 2014, Arnault-Rollier et. al., 1999; Nieminen et. al., 2012; Nieminen et.al., 2012; Pothakos et. al., 2016; Ranjltkar et. al., 2016).

#### 2.4. Objetivos

Los objetivos generales del presente trabajo fueron:

- Determinar la capacidad de formación de biofilms monoespecie por parte de distintos microorganismos alterantes aislados de la carne y del tracto gastrointestinal del pollo, en idénticas condiciones ambientales.
- Evaluar el efecto de biofilms preimplantados de *L. gasicomitatum* sobre la viabilidad de *P. fragi* y *L. reuteri*, así como el tipo de interacción ejercida.

Asimismo, los objetivos específicos fueron:

- Determinar la capacidad de formación de biofilms por *P. fragi* y estudiar la composición en macromoléculas de la matriz.
- Determinar la capacidad de formación de biofilms de *L. reuteri* y estudiar la composición en macromoléculas de la matriz.
- Determinar la capacidad de formación de biofilms de *L. gasicomitatum* y estudiar la composición en macromoléculas de la matriz.
- Investigar la capacidad de *P. fragi* para crecer y sobrevivir en la matriz que forma *L. gasicomitatum*.
- Investigar la capacidad de *L. reuteri* para crecer y sobrevivir en la matriz que forma *L. gasicomitatum*.

Mediante este estudio se pretende ampliar la información respecto a la generación de biofilms de microorganismos alterantes *in vitro* con el objetivo de obtener, a futuro, metodologías más eficientes en la erradicación de los mismos, respondiendo así a una necesidad inminente para la industria alimentaria.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Superficie bajo estudio**

Para la realización de los diferentes ensayos se utilizaron discos de acero inoxidable 316, de 2 cm de diámetro y 1 mm de grosor. Dichos discos tuvieron que someterse a un proceso de limpieza y desinfección para el cual se utilizó un detergente neutro concentrado (ADIS Higiene, Madrid, España), e iso-propanol al 70 % (2-propanol, Panreac Química, Castellar del Vallés, Barcelona, España). En primer lugar, se prepararon unos botes de plástico con 20-30 ml de detergente y agua y se dejaron los discos en el interior de los mismos durante 60 minutos. Tras este tiempo, se enjuagaron uno por uno y se eliminó la suciedad que pudieran tener. A continuación, se sumergieron en iso-propanol al 70 % y se dejaron durante 15 minutos. Por último, se secaron mediante el empleo de una cabina de flujo laminar durante 15 minutos, tal y como indica la normativa europea UNE-EN 13697 (AENOR, 2002) referente a ensayos en superficies no porosas. Una vez secos y previo a los ensayos, los discos se autoclavaron durante 15 minutos a 121°C para asegurar la esterilidad completa de los mismos.

#### **3.2. Cepas microbianas**

Para el presente estudio se escogieron tres cepas de microorganismos alterantes: *Leuconostoc gasicomitatum* CECT 5767, *Pseudomonas fragi* CECT 446 y *Lactobacillus reuteri* CECT 925. Todas las cepas que se utilizaron en este estudio se adquirieron de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). El nexo común entre todas ellas fue su aislamiento en carne y tracto gastrointestinal del pollo y, por lo tanto, su relación como microorganismos alterantes en la industria cárnica (Wang et. al., 2014; Ranjltkar et. al., 2016; Niemeinen et. al., 2012; Pothakos et. al., 2015).

### 3.3. Recuperación de cultivos liofilizados

Las cepas se encontraban en estado liofilizado y fueron rehidratadas en Caldo Triptona de Soja (TSB; BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) e incubadas a 30°C durante 40-48 horas. Posteriormente, la suspensión fue sembrada por agotamiento en placas de Agar Triptona de Soja (TSA; Oxoid, Madrid, España) y cultivadas a 30°C durante 48 horas. Finalmente, las colonias aisladas de dichas placas fueron resembradas en estría en nuevas placas de TSA e incubadas a 30°C durante 24 horas, obteniendo así un cultivo puro de las cepas seleccionadas. Finalmente, se almacenaron como cultivos stock a una temperatura de 4°C durante un periodo máximo de un mes.

### 3.4. Biofilms monoespecie

Para la formación de los biofilms monoespecie se procedió. En primer lugar, a realizar una resiembra en estría de cada una de las cepas en una placa con medio TSA y se incubó a 30°C durante 24 horas.

#### 3.4.1. Preparación del inóculo

Para preparar el inóculo se utilizaron placas con cultivos de 24 horas en fase estacionaria. Se inocularon colonias aisladas procedentes de estos cultivos en tubos de 10 ml de TSB para el caso de *P. fragi* y *L. gasicomitatum*, y de MRS (Oxoid, Hampshire, Inglaterra) para el caso de *L. reuteri*, hasta alcanzar una turbidez de 1,2 – 1,5 unidades McFarland. A continuación, se realizaron diluciones decimales en TSB hasta alcanzar una concentración de  $10^6$  UFC/ml, pues fue la concentración microbiana establecida para los ensayos de formación de biofilms (Ripolles-Avila et. al., 2018). Se observó que *L. reuteri* CECT 925 en medio TSB tenía un crecimiento muy leve, con colonias muy pequeñas y translúcidas, por lo que se decidió utilizar el caldo MRS como medio para la formación de biofilms por ser un medio específico para bacterias del ácido láctico (Wang et al, 2014).

#### 3.4.2. Formación de biofilms monoespecie

Para la formación de los biofilms se sembraron 30 µl de la suspensión microbiana en el centro de cada disco. Estos discos se colocaron en placas de Petri estériles y posteriormente se introdujeron en una cámara húmeda, donde fueron mantenidos en condiciones de saturación de humedad para evitar la desecación, e incubados a 30°C (Fuster-Valls et. al., 2008). Se les realizaron lavados a las 24, 48 y 72 horas, no

siempre en este orden, pero sí dentro del intervalo, en 7 días como periodo de incubación (Ripolles-Avila et. al., 2018). Los lavados se realizaron con agua destilada estéril en dos tiempos, 3 ml y 3 ml, con el disco inclinado. A continuación, se añadieron 30 µl de TSB para los ensayos con *P. fragi* y *L. gasicomitatum*, y 30 µl de MRS en el caso de *L. reuteri*, para aportar nutrientes a los biofilms bajo generación y se dejaron, de nuevo, en incubación.

#### 3.4.3. Evaluación por microscopía de epifluorescencia directa (DEM)

Se empleó la técnica DEM por ser una de las más adecuadas para la evaluación de la estructura de biofilms en superficies alimentarias (Pontefract, 1991; Yuste, 2005). Una vez finalizado el periodo de incubación, se lavaron las superficies y se tiñeron con una tinción específica denominada Live/Dead BacLight (Molecular Probes, Oregon, EE.UU.) que permite cuantificar el número de células viables y no viables. Este kit está compuesto por dos ácidos nucleicos fluorescentes: SYTO9 que marca de color verde las células cuya membrana se encuentra intacta, y el ioduro de propidio (PI), que penetra y tiñe de color rojo las células muertas o con su membrana dañada (Ripolles-Avila et. al., 2019). Al emplear conjuntamente los dos agentes fluorescentes, se permite la observación de las células con la membrana intacta (viables – verdes) y de las células dañadas o muertas (no viables – rojo) (Montañez-Izquierdo et al. 2011). Para realizar este procedimiento, se lavaron las superficies de los discos con agua destilada estéril con el objetivo de desprender aquellas células no adheridas y, a continuación, se le añadieron 5 µl de la tinción. Tras la aplicación, los discos se dejaron incubar a temperatura ambiente en oscuridad durante un total de 15 minutos. Posteriormente, las superficies fueron observadas por DEM, usando el microscopio de epifluorescencia Olympus BX51/BX52 (Olympus, Tokyo, Japón). Este microscopio está equipado con una lámpara de mercurio de 100W (USH-103OL, Olympus, Tokyo, Japón) y conectado a una cámara digital DP73 (Olympus, Tokyo, Japón).

Los discos se observan con el objetivo de 20X para determinar la estructura de los biofilms y comprobar que hubiera formación de los mismos, así como para observar su viabilidad y contabilizar la totalidad celular que los formaba. Para la cuantificación de las células viables y no viables se tomaron 10 fotografías al azar por cada muestra. De esas 10 fotografías, se eligieron 5 para su posterior análisis. Para ello, fueron tratadas para equiparar su contraste, con el procesador de imágenes de Olympus y

posteriormente analizadas utilizando los sistemas automatizados del software del microscopio (cellSens, Olympus, Tokyo, Japón). Se obtuvo el área promedio de las células y la superficie ocupada por el biofilm en cada fotografía. El número total de células se obtuvo dividiendo la superficie media ocupada por el biofilm entre el área de las células y, tras una serie de cálculos, los resultados se expresaron como el logaritmo del número de unidades formadoras de colonias (UFC) por centímetro cuadrado.

A parte del estudio sobre la viabilidad celular, también se realizó un estudio de composición de la matriz del biofilm mediante la misma técnica de microscopía. Para ello, se empleó una mezcla de tintes que daban lugar a un combo que permitía la tinción de los diferentes componentes. Este combo estaba compuesto por 10  $\mu$ l de fluoresceína-5-isotiocianato (FITC; Sigma-Aldrich, Madrid, España), que tiñe las proteínas con una coloración verde; 20  $\mu$ l de concanavalina A-Alexa Fluor 594 (ConA 594; ThermoFisher Scientific, Barcelona, España), que tiñe los azúcares de color rojo y 20  $\mu$ l de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI, ThermoFisher Scientific, Barcelona, España), que es un marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de ADN marcándolas de color azul. Este combo de tinción se completaba hasta los 200  $\mu$ l con 0,1 M de bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ , Panreac, Casellar del Vallès, España). Para realizar esta tinción se lavaron las superficies de los discos y se añadieron 100  $\mu$ l del combo en cada disco, a continuación, se mantuvieron en incubación a temperatura ambiente en oscuridad total durante 30 minutos. Tras este tiempo, se volvieron a lavar con 1 ml de agua destilada estéril y se procedió a observar los discos con el objetivo de 20X como en el anterior estudio. En este caso se realizaron fotografías de 5 áreas diferentes de cada disco, aunque por cada área fotografiada se tomaron tres fotografías en campos distintos con el objetivo de visualizar los distintos colores que correspondían a la tinción de proteínas, azúcares y ADN. El análisis de estas imágenes se realizó con el procesador de imágenes de Olympus y posteriormente se analizaron utilizando los sistemas automatizados del software del microscopio. En un primer lugar se unieron las tres imágenes correspondientes a los tres filtros en una sola para, posteriormente, obtener el área promedio de las macromoléculas y la superficie ocupada por el biofilm. Los resultados se expresaron en porcentaje de cada una de las macromoléculas. Para ello, se sumaron las áreas que ocuparon cada una de las macromoléculas y se dividió el área ocupada por cada macromolécula entre el área total.



### 3.5. Preimplantación de *L. gasicomitatum* en superficies de acero inoxidable y efecto sobre la posterior colonización por *P. fragi* y *L. reuteri*

#### 3.5.1. Preparación del inóculo

En primer lugar, se procedió a realizar una preimplantación de *L. gasicomitatum* sobre las superficies empleadas en el estudio. Para ello, se realizó una resiembra en estría de la cepa *L. gasicomitatum* en una placa con medio TSA y se incubó a 30°C durante 24 horas. A continuación, se sembraron colonias aisladas del cultivo preparado en tubos de TSB hasta alcanzar una turbidez de 1,2 – 1,5 unidades McFarland. Posteriormente, se realizaron diluciones decimales en TSB hasta alcanzar una concentración de  $10^6$  UFC/ml, tal y como está descrito en el apartado 2.4.1.

#### 3.5.2. Preimplantación de *L. gasicomitatum* y posterior colonización

Se procedió, a continuación, a la preimplantación del microorganismo a la superficie siguiendo el mismo protocolo que para la formación de biofilms mono especie. Para ello, se sembraron 50 µl de la suspensión microbiana de ensayo en el centro de cada disco. En este caso, se incluyeron en el diseño experimental tanto discos que actuarían como control y así comprobar su crecimiento tras los 7 días de formación, como discos para la posterior colonización con las otras cepas bacterianas. El protocolo de incubación, lavado y renovación de medio de cultivo se realizó siguiendo el mismo procedimiento que en el apartado 2.4.2. con la única diferencia de añadir 50 µl del medio TSB estéril como reposición nutritiva. Tras los 7 días de formación de los biofilms de *L. gasicomitatum* se procedió a realizar la inoculación de las dos cepas bacterianas sobre la estructura preimplantada. Para ello, se resembraron en estría en medio de TSA tanto *P. fragi* como *L. gasicomitatum* y se incubaron a 30°C durante 24 horas. Se prepararon los inóculos siguiendo el mismo procedimiento que en el apartado 2.4.1. hasta obtener una concentración de  $10^6$  UFC/ml y, a continuación, se inocularon sobre los biofilms preimplantados de la cepa *L. gasicomitatum*. Estos discos se mantuvieron en una cámara húmeda a 30°C durante 24, 48 y 72 h. A las 24 horas se extrajeron dos discos para proceder a su lectura, a las 48 horas lo mismo con otros dos discos y por último a las 72 horas. De esta forma, se pudo obtener una respuesta sobre la interacción ejercida a diversas horas de incubación.

### 3.5.3. Evaluación de los biofilms multiespecie mediante recuento en placa

Para la lectura de los biofilms mixtos se empleó el recuento de colonias en placas con medio específico para poder diferenciar ambas cepas cuando se encontraban en biofilm multiespecie. Una vez transcurrido el periodo de incubación establecido para los biofilms multiespecie (24, 48 y 72 horas), se procedió a su cultivo en placas para poder determinar el crecimiento bacteriano de cada una de las cepas. En primer lugar se lavaron las superficies de los discos en dos tiempos (3 ml y 3 ml) con el objetivo de desplazar aquellas células que no formaban parte de la estructura del biofilm, y a continuación, se introdujeron los discos en frascos de plástico estériles en cuyo interior contenía 3,5 gramos de perlas de vidrio estériles más 10 ml de agua de peptona. Se agitaron los frascos mediante vortex durante 90 segundos con el objetivo de desprender las células que conformaban los biofilms (Ripolles-Avila et. al., 2019). A partir de aquí, se procedió a realizar un banco de diluciones seriadas para poder cultivarlas en el medio específico diseñado. Al hacer biofilms que contenían dos especies diferentes, se tuvo que diseñar un medio de cultivo que permitiera la diferenciación de ambas especies. Para ello se buscó algún azúcar que solo pudiera metabolizarse por una de las dos cepas. En el caso de *L. gasicomitatum* se vio que metabolizaba la esculina, sin embargo, tanto *P. fragi* como *L. reuteri* no (BacDive, Braunschweig, Alemania). Ello permitió elaborar un medio compuesto por TSA, esculina (Sigma, Reino Unido) y citrato de hierro (Aldrich, Japon), se emplea este compuesto. De esta manera las colonias de *L. gasicomitatum* viraban a color negro y se podían diferenciar fácilmente de las otras dos cepas empleadas así como también se pudieron observar diferencias a nivel morfológico. Las placas se incubaron a 30°C durante 48 horas y se realizó el recuento de colonias tras ese tiempo. Se fue eligiendo en cada caso la dilución que mejor representaba el crecimiento de ambas cepas y que permitía un mejor recuento, por lo tanto, de cada disco solo se utilizó una dilución para el recuento

### 3.6. Análisis estadístico

Para todos los estudios realizados, se hicieron dos discos por cada repetición en un total de tres repeticiones en diferentes días (n=6) por cada especie. Los recuentos bacterianos obtenidos se convirtieron en valores logarítmicos decimales para reducir la variabilidad de los ensayos microbiológicos. Los resultados fueron evaluados por One way ANOVA seguido del contraste de Tukey mediante el paquete de software estadístico SPSS Statistics IBM 23. Un  $P < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Evaluación de la capacidad de formación de los biofilms monoespecie

El objetivo principal de este estudio fue conocer la capacidad de formación de biofilms de *P. fragi*, *L. reuteri* y *L. gasicomitatum*, mediante el recuento de las células viables y no viables, así como la observación de la estructura generada y la organización celular establecida. Se consideró importante realizar esta evaluación ya que no todos los microorganismos son capaces de formar biofilms en superficies de acero inoxidable, o de formarlos con la misma intensidad. Por ejemplo, *Campylobacter* spp., no suele formar biofilms propios y solo consigue persistir en la industria alimentaria invadiendo biofilms formados por otros microorganismos (Phillips, 2016). De esta forma, se podría establecer que si, en condiciones industriales, estos microorganismos acaban en una superficie de acero inoxidable, se podrían constituir en forma de biofilm y persistir, pudiendo llegar a producir contaminaciones cruzadas a productos alimentarios.

Las tres bacterias empleadas en el estudio, *P. fragi*, *L. reuteri* y *L. gasicomitatum*, demostraron poder adherirse y desarrollarse, aunque a diferentes intensidades (**Tabla 1**). Tal y como se puede observar, el recuento total de células que conformaron los biofilms de *L. reuteri* y *L. gasicomitatum* difirieron significativamente ( $P < 0,05$ ) de la otra especie bajo estudio. Este resultado podría ser debido a que *P. fragi* no se adhirió con suficiente fuerza a la superficie y, por lo tanto, al realizar los lavados se pudo perder parte de la estructura del biofilm juntamente con las células. En este sentido, las propiedades que tienen las distintas superficies empleadas en la industria alimentaria difieren entre ellas, lo que influye directamente en la adhesión microbiana y la posterior formación de biofilms (Garrett et. al. 2008). Por ello, *Pseudomonas* spp. podría tener una mayor afinidad para adherirse en otro tipo de superficies tales como plásticos (Martinez-Martinez et. al. 1991).

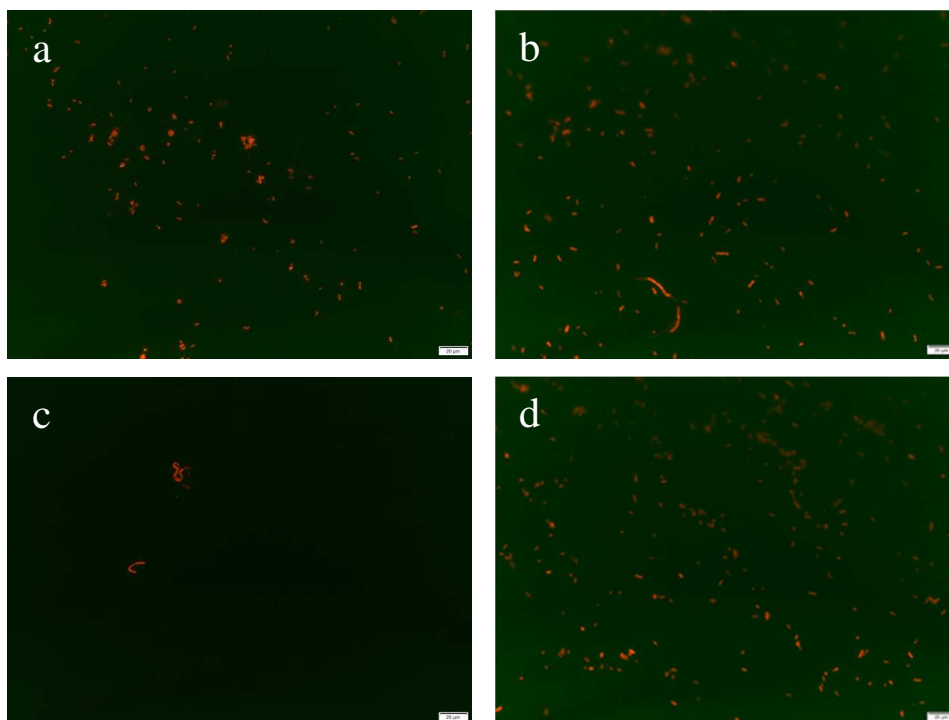
**Tabla 1.** Recuento total y porcentaje de supervivencia de las células que conformaron a los biofilms generados por las diferentes especies bacterianas. Cada valor corresponde a una media de dos repeticiones realizadas en tres días separados ( $n = 6$ ), calculándose a su vez el error estándar de la media. Los valores dentro de una columna que carecen de un superíndice común difieren significativamente ( $P < 0,05$ ).

	Recuento total (Log UFC/cm <sup>2</sup> )	% Supervivencia
<i>P. fragi</i>	4,82 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,03 ± 0,02 <sup>a</sup>
<i>L. reuteri</i>	7,10 ± 0,05 <sup>b</sup>	10,35 ± 5,85 <sup>a</sup>
<i>L. gasicomitatum</i>	7,05 ± 0,26 <sup>b</sup>	0,92 ± 0,87 <sup>a</sup>

Como se puede observar en la **Tabla 1**, también se midió el porcentaje de supervivencia de los biofilms generados por las tres especies bacterianas, mediante la comparación entre el recuento de células viables, frente a las células no viables, todas ellas formando parte de la estructura producida. El porcentaje de células viables resultante osciló entre 0,03 % y 10,34 %, siendo el mayor porcentaje correspondiente a los biofilms de *L. reuteri*. A pesar de ello, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0.05$ ) entre ninguna de las especies. El hecho de que el recuento de células no viables sea tan elevado podría deberse a diversas razones. Una de ellas podría ser que, con tiempos de incubación largos, las bacterias que conforman el biofilm pueden llegar a superar su propia curva de crecimiento exponencial, superando la fase estacionaria y ocasionando la muerte celular, lo que ayuda a dar estructura al sistema y una nueva fuente de energía para las células que permanecen viables en el biofilm (Ripollés-Avila, 2018). De hecho, esto ha sido observado en el estudio de biofilms de otros microorganismos, como *Bacillus subtilis*, en cuyas células no viables generan estructuras tridimensionales complejas además de constituir una respuesta de estrés a nivel comunitario, para mejorar la resistencia de los biofilms a condiciones desfavorables del medio ambiente (Asally et al., 2012). Otra de las razones que podría explicar el elevado número de células no viables respecto a células viables podría ser la técnica analítica empleada. Al utilizar DEM como metodología para su evaluación no se está teniendo en consideración la profundidad de la estructura ya que esta técnica analítica solo permite tener una imagen en 2D, sin embargo los biofilms son estructuras en 3D, por lo que para poder evaluar la presencia de células viables en el interior del biofilm se deberían utilizar otras técnicas como podría ser la microscopia láser confocal, la cual permite realizar reconstrucciones y análisis en tres dimensiones de las imágenes

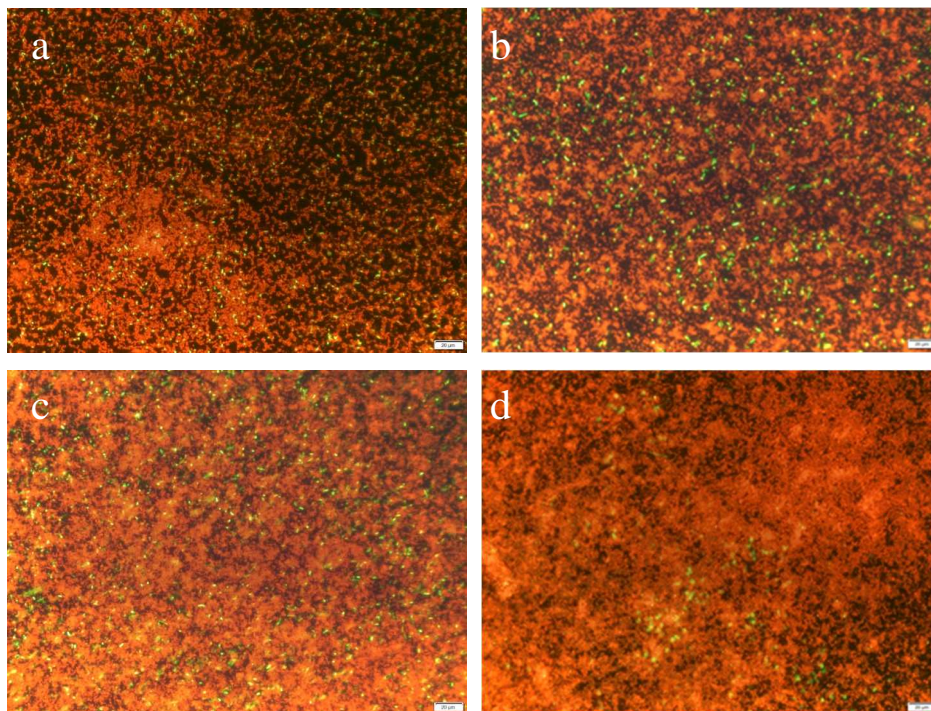
adquiridas (López-Macay et al. 2016). En este sentido, las células no viables se localizan preferentemente en las capas más externas del biofilm, sin consumir sustrato, dejando que éste penetre en el interior de la estructura para alimentar a las capas de células más internas, y ejerciendo un cierto papel protector contra posibles agentes antimicrobianos (Chambless et al. 2006). Es por ello por lo que se podría subestimar el recuento de células en estado viable.

La formación de biofilms puede determinarse en función de la organización de las células que lo conforman, mediante la observación por DEM (Ripolles-Avila, 2018). De acuerdo con esto, una disposición de células desagregadas indica que los biofilms no se han formado, mientras que cuando las células comienzan a agregarse y a formar una red tridimensional, se puede suponer que un biofilm, con una estructura organizada y compacta, se ha establecido en la superficie (Chmiellewski y Frank, 2003). Se considera que es una medida observacional importante, ya que por el hecho de obtener un recuento de células adheridas a la superficie no implicaría que éstas hubieran desencadenado la formación de biofilms. Este hecho se puede observar en la **Figura 4**, correspondiente a *P. fragi*. Para esta bacteria, se obtuvo un recuento total de 4,82 Log UFC/cm<sup>2</sup> y sin embargo no se pudo observar ninguna red de conexión entre células, encontrándose completamente dispersas en la superficie. Por ello, se puede afirmar que, bajo las condiciones experimentales ensayadas, *P. fragi* no tuvo la capacidad para formar biofilms.

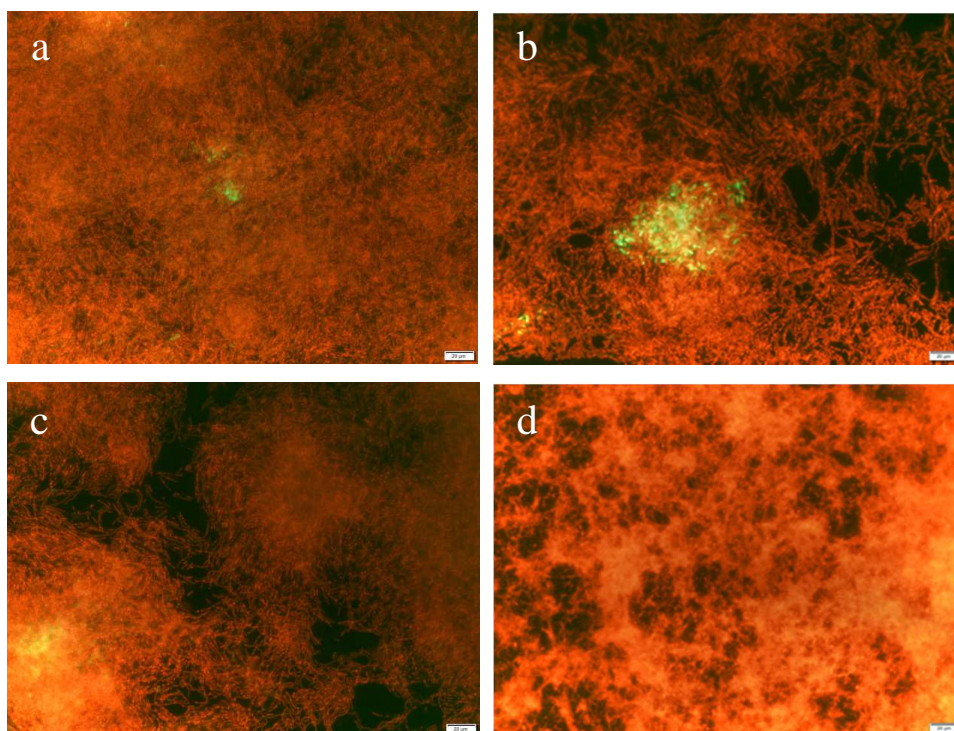


**Figura 4.** Imágenes obtenidas mediante DEM para el recuento de células viables y no viables de *P. fragi* mediante tinción Live/Dead.

Sin embargo, *L. reuteri* y *L. gasicomitatum* tuvieron un comportamiento opuesto. En primer lugar, ambos microorganismos demostraron tener recuentos del orden de 7 Log UFC/cm<sup>2</sup>, sin diferencias significativas entre ellos ( $P > 0,05$ ). A diferencia de *P. fragi*, éstos podrían haberse adherido con más fuerza en la superficie del disco, resistiendo de este modo a los lavados. El objetivo de los lavados fue siempre descartar aquellas células no adheridas a la superficie y que por tanto no formaran parte de la estructura. No obstante, podría ser un condicionante para desprender a los biofilms bajo producción, si éstos fueran débiles. En este caso, no se observó que influyera pues, tanto *L. reuteri* como *L. gasicomitatum*, demostraron tener una alta capacidad de formación de biofilms al presentar una estructura compleja y altamente ordenada (**Figura 5 y 6**). En ambas especies se observa como la estructura incluye conglomerados celulares con huecos intersticiales, por lo que se podrían considerar biofilms maduros (Ripolles-Avila et al. 2018). Se ha sugerido que las áreas vacías, es decir, los huecos intersticiales, pueden representar canales de agua, que promueven la constante circulación de nutrientes y la eliminación de residuos (Costerton et al., 1995; Donlan y Costerton, 2002; Ripolles-Avila et al., 2018).



**Figura 5.** Imágenes obtenidas mediante DEM para el recuento de células viables y no viables de *L. reuteri* mediante tinción Live/Dead.



**Figura 6.** Imágenes obtenidas mediante DEM para el recuento de células viables y no viables de *L. gasicomitatum* mediante tinción Live/Dead.

Finalmente, es interesante resaltar que en las estructuras celulares generadas por *L. reuteri* y *L. gasicomitatum* para la formación de los biofilms se observa una coloración



amarilla en ciertas zonas. Esta coloración podría deberse a la lisis celular con la consecuente liberación de ADN-e (Ripolles-Avila, 2018). Sin embargo, también podría deberse a la superposición de células viables y no viables (color verde y rojo, respectivamente), que al mezclarse daría lugar al color amarillo. Esto indicaría de nuevo que la estructura alberga células viables en las zonas más profundas, aunque se necesitarían más estudios para demostrar o descartar esta teoría.

#### 4.2. Evaluación de la composición de la matriz de los biofilms monoespecie

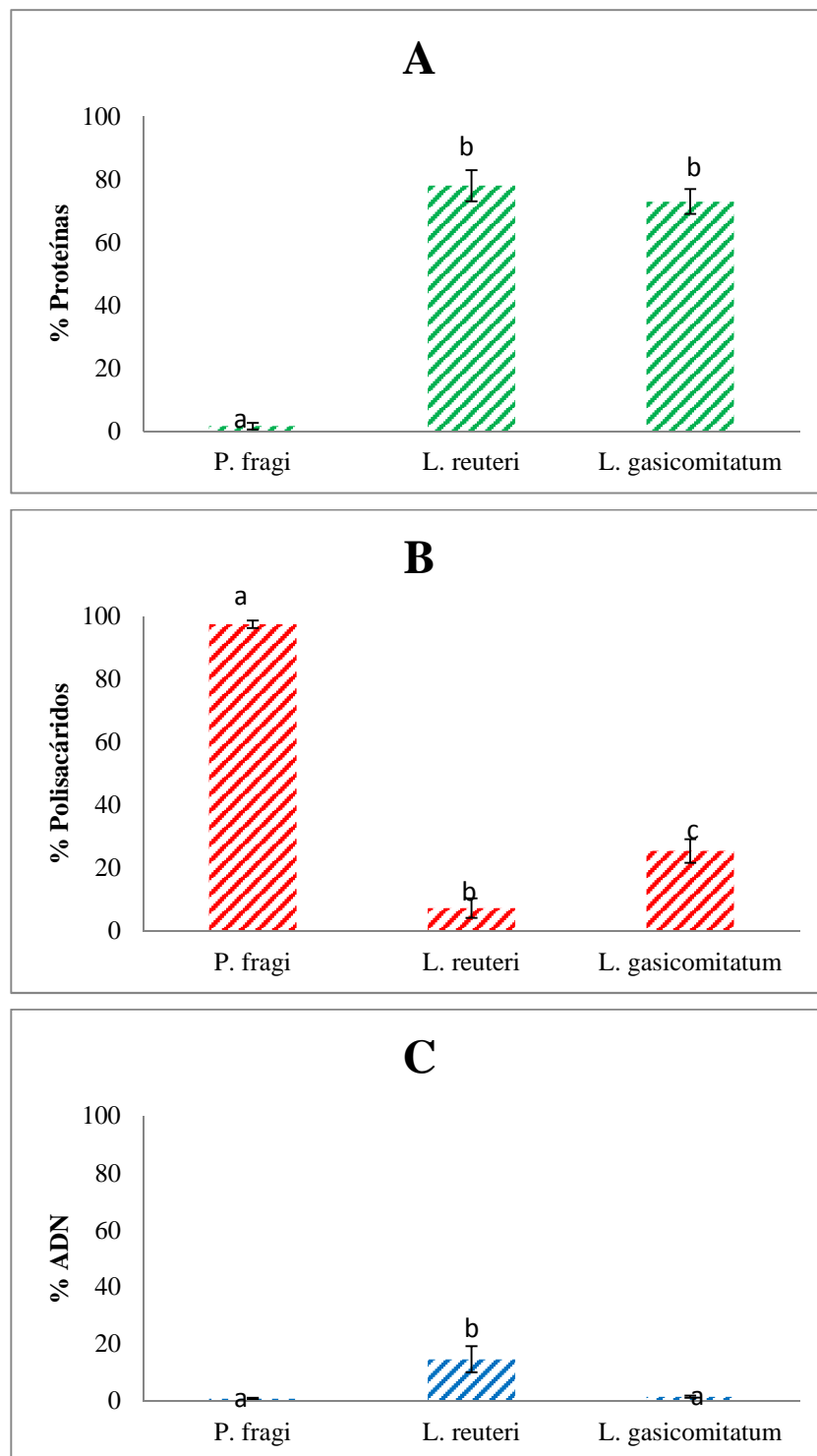
La producción de la matriz, que engloba y estructura a los biofilms, fue evaluada para las tres especies bacterianas mediante DEM. Su estudio presenta un gran desafío, debido a la gran cantidad y heterogeneidad de biopolímeros y otras sustancias que la conforman (Colagiorgi et al. 2016). No obstante, su evaluación tanto a nivel cualitativo como cuantitativo es de gran interés, ya que los resultados pueden suponer un avance para el desarrollo de productos que se empleen en su eliminación.

En la **Figura 7** se muestran los resultados obtenidos a nivel cuantitativo sobre la composición en macronutrientes de los biofilms formados por las tres especies bacterianas. *L. reuteri* y *L. gasicomitatum* fueron las especies que presentaron un mayor porcentaje en contenido proteico (**Figura 7-A**), sin diferencias significativas ( $P = 0,605$ ) entre ellos, aunque sí con *P. fragi* ( $P < 0,05$ ). Estos resultados están en concordancia con lo sugerido por Combrouse et al. (2013) y Colagiorgi et al. (2016), quienes demuestran que la matriz producida por *Listeria monocytogenes* es mayoritariamente proteica. Durante los últimos años, los compuestos que conforman la matriz extracelular de los biofilms microbianos han sido sujeto de controversia, al establecer como mayoritarios a aquellos conformados principalmente por polisacáridos. No obstante, diferentes estudios han establecido que la naturaleza de la matriz producida es dependiente de la especie bacteriana (Colagiorgi et al. 2017; Ripolles-Avila et al., 2018), algo que también se ha podido observar en presente estudio. De forma opuesta, *P. fragi* demostró tener un predominio de polisacáridos como compuesto estructural en la matriz (**Figura 7-B**), presentando diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) frente a las otras dos especies. Los resultados obtenidos son conformes con otros estudios realizados sobre la matriz que produce *Pseudomonas* spp., los que concluyen que la mayoría están formados por compuestos hidrocarbonados, en especial por alginato (Nouha et al. 2017). Todo ello podría llevar a pensar que la naturaleza de la matriz



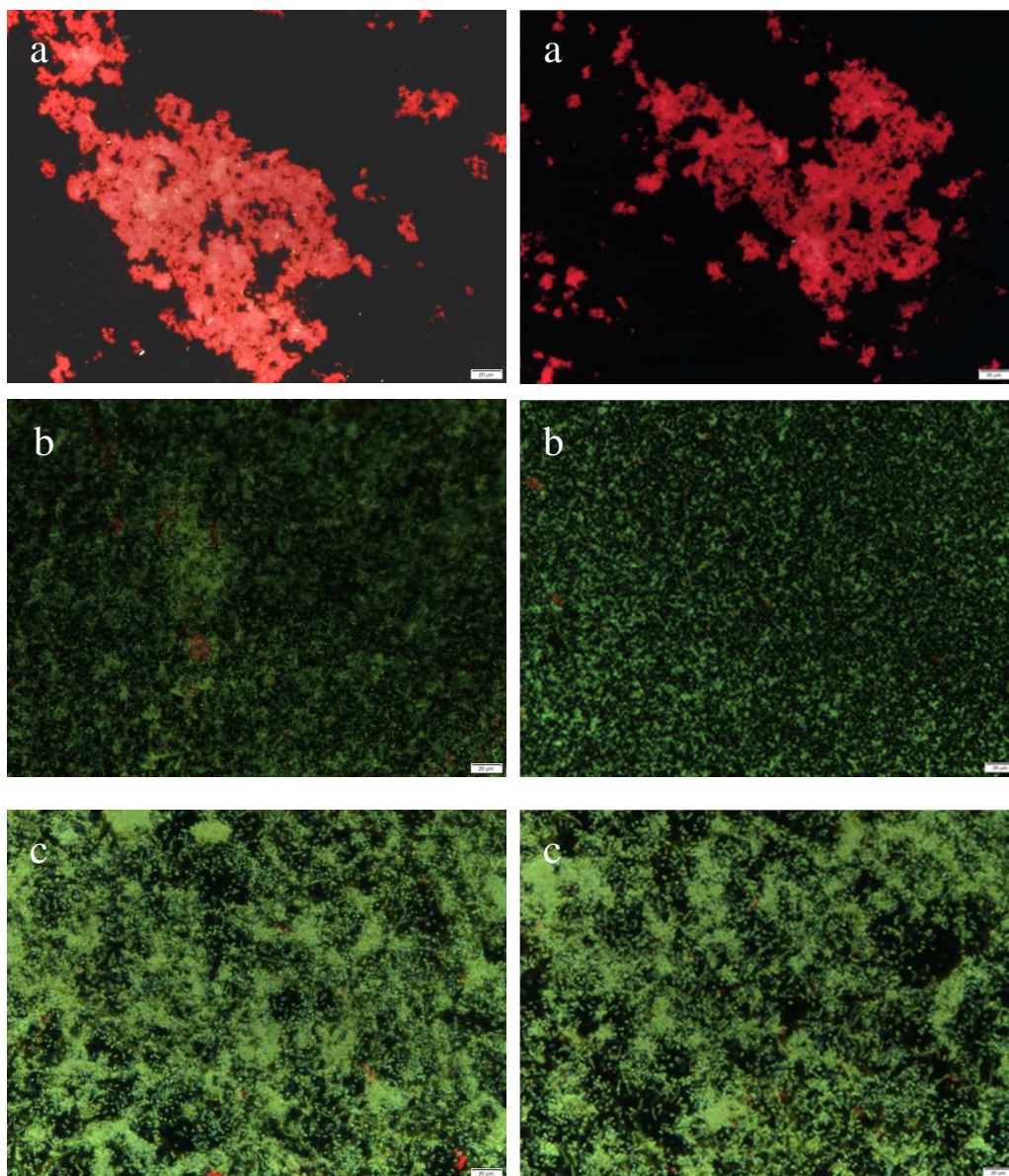
producida podría estar relacionada con las características de la pared celular. En este sentido, se ha demostrado que bacterias Gram negativas tales como *Salmonella* spp., *Acetobacter xylinum* o *Legionella pneumophila* producen biofilms en su mayoría con composición polisacárida (Wang et al. 2016; Nouha et al. 2017; Peterson et al. 2018), al igual que los resultados obtenidos para *P. fragi*. Diferentemente, en bacterias Gram positivas tal y como describe Colagiorgi et al. (2016) para *L. monocytogenes*, la matriz que producen es principalmente proteica. Este último hecho, es el que también se ha observado para *L. reuteri* y *L. gasicomitatum* en el presente estudio.

Por último, se determinó el porcentaje de ADNe como parte integrante de la composición de la matriz de dichos biofilms (**Figura 7-C**). Se observó que entre *P. fragi* y *L. gasicomitatum* no hubieron diferencias significativas ( $P = 0,983$ ), sin embargo *L. reuteri* sí que las presentó con *P. fragi* ( $P = 0,001$ ) y con *L. gasicomitatum* ( $P = 0,002$ ), siendo este último el que obtuvo un mayor porcentaje. Se ha observado que el ADNe tiene, no solo un papel estructural en el interior de los biofilms microbianos, sino que también se ha demostrado que sirve como fuente de energía y nutrientes (Zetzmann et al. 2015; Flemming y Wingender 2010). Esto último podría ser una de las razones por las cuales los biofilms tengan una proporción tan baja de este compuesto.



**Figura 7.** Representación de los porcentajes en macronutrientes que conforman la matriz de los biofilms de las diferentes especies bacterianas: (A) proteínas; (B) polisacáridos; (C) ADN. Las columnas que carecen de una letra común difieren significativamente ( $P < 0,05$ ). Las barras de error nos indican el error estándar de la media (SEM).

A nivel cualitativo y a diferencia de los resultados obtenidos en el estudio sobre viabilidad celular, se observó que *P. fragi* presentó algunas zonas con estructuras organizadas y definidas (**Figura 8-a**). Éstas, en concordancia con lo presentado en el estudio cuantitativo, estaban conformadas por polisacáridos. Cabe destacar que, este resultado fue notable puesto que se esperaba que no hubiera formado ninguna matriz extracelular, al no demostrar capacidad para producir conglomerados celulares y con ello biofilms. A pesar de que no hubiera formación de biofilms, se puede decir que hubo cierta actividad celular al observarse la producción de estos compuestos. En el caso tanto de *L. reuteri* como *L. gasicomitatum* (**Figura 8-b** y **Figura 8-c**), las proteínas se encuentran en la masa del biofilm con una clara dominancia, mezcladas mínimamente con algunos componentes glucídicos, entre los que podrían encontrarse glicoproteínas y mucopolisacáridos (Ripolles-Avila, 2018). Sin embargo, en la superficie, parece haber una dominancia de la presencia de proteínas. El ADN<sub>e</sub> aparece como un componente minoritario y disperso en toda la matriz. Es interesante destacar que los resultados obtenidos en el presente estudio podrían servir para el desarrollo de productos específicos y eficaces a aplicar como nuevas estrategias de limpieza y desinfección, al conocer los componentes principales a los que hay que atacar en cada especie.



**Figura 8.** Imágenes obtenidas mediante DEM para la cuantificación de macromoléculas (proteínas, polímeros y ADN). (a): *P. fragi*; (b): *L. reuteri*; (c): *L. gasicomitatum*

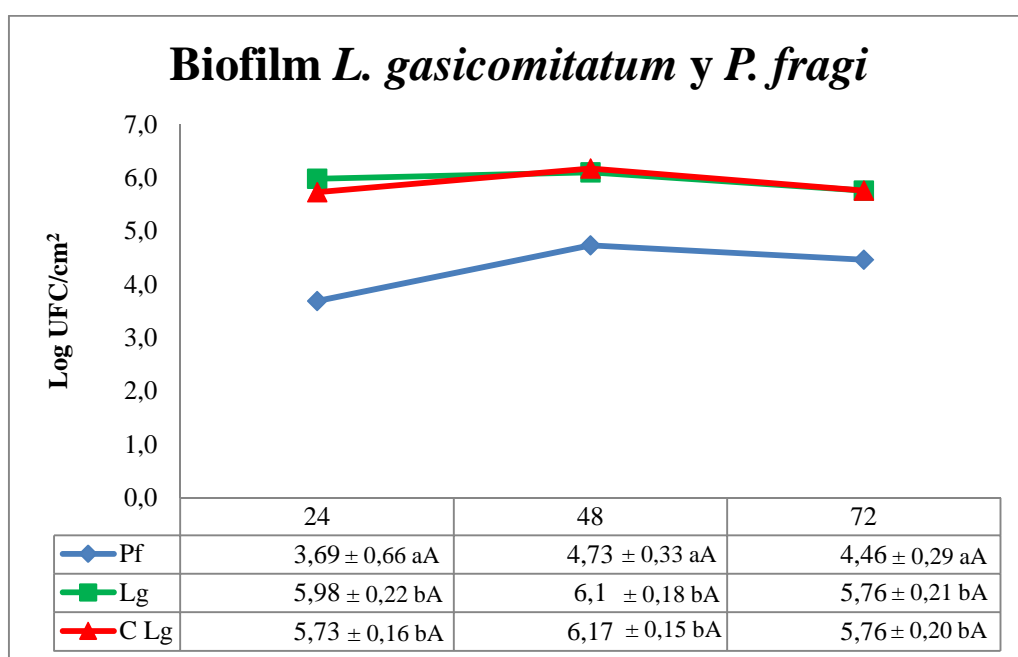
#### 4.3. Preimplantación de *L. gasicomitatum* e influencia en el crecimiento de *P. fragi* y *L. reuteri*

Las comunidades de microorganismos que conforman los biofilms pueden estar compuestas por una o por múltiples especies, aunque son estos últimos los que predominan en la industria alimentaria (Bridier et al. 2015). Muy pocos estudios intentan recrear una comunidad microbiana multiespecie y ver, así, cómo los diferentes microorganismos interactúan entre sí, ya que son procedimientos difíciles de realizar (Hascoët, 2019). El objetivo principal de este estudio fue la evaluación del efecto de biofilms preformados de *L. gasicomitatum* sobre las dos restantes especies bacterianas

bajo estudio, *P. fragi* y *L. reuteri* para, de este modo, observar la influencia en la posterior adhesión y crecimiento. En este sentido, se eligió *L. gasicomitatum* como microorganismo base porque en estudios previos sobre el aislamiento de microbiota residente en una industria procesadora de cerdo ibérico llevados a cabo por Ripolles-Avila (2018) y Hascoët (2019) se encontró que *Leuconostoc* spp. fue uno de los géneros más predominantes dentro de los microorganismos aislados de las propias instalaciones, revelando la importancia que puede tener en la contaminación cruzada de productos. Asimismo, al quedar remanente en las superficies, podría generar biofilms maduros y que otros microorganismos se le pudieran adherir. Se investigó, por consiguiente, si tanto *P. fragi* como *L. reuteri* eran capaces de sobrevivir e incluso crecer en la estructura formada por *L. gasicomitatum*, sirviéndoles de soporte y protección.

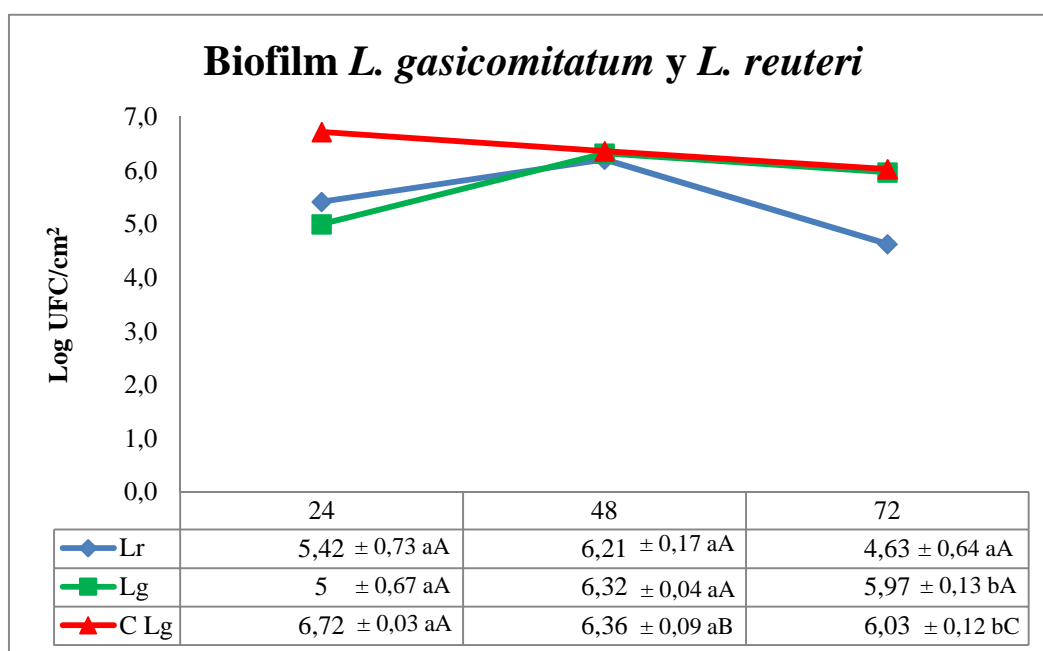
Los resultados obtenidos para los biofilms entre *L. gasicomitatum* y *P. fragi* se muestran en la **Figura 9**. En las anteriores pruebas experimentales, se observó que *P. fragi*, aun teniendo un cierto recuento de células en la superficie no pudo generar un biofilm maduro. Por consiguiente, se propuso que el microorganismo presentó muy poca fuerza de adhesión en la superficie de acero inoxidable y, consecuentemente, éste se perdía. Sin embargo, en la presente prueba experimental se ha podido observar que *P. fragi* convive e incluso crece de forma exponencial en comunidad multiespecie con *L. gasicomitatum* durante las primeras 48 horas. Transcurrido este tiempo de incubación y llegando hasta las 72 horas, la población de *P. fragi* desciende, posiblemente por la competencia por los nutrientes que empezarían a escasear, ya que no se repusieron. Estos resultados están en concordancia con lo sugerido por Flemming et al. (2016), que indica que el agotamiento de nutrientes provoca un aumento de la competencia y, por lo tanto, de muerte celular. Otra observación que cabe destacar sería, al inocular *P. fragi* en el biofilm preimplantado de *L. gasicomitatum* y transcurrir 24 horas de incubación, los recuentos de *L. gasicomitatum* no se vieron alterados por *P. fragi*, al coincidir con el control plenamente y sin presentar diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) en ninguno de los tiempos de incubación. *P. fragi*, sin embargo, sí que las presentó a lo largo de todo el proceso de convivencia en biofilm multiespecie ( $P < 0.05$ ). Es por ello que se puede sugerir que el crecimiento de *L. gasicomitatum* no se ve afectado por la presencia de *P. fragi* en el medio. Los resultados obtenidos mediante DEM en el estudio de biofilms monoespecie de *P. fragi* (recuento de células totales 4,82 Log UFC/cm<sup>2</sup> y tasa de supervivencia 0,03 %) fueron similares a los obtenidos cuando se encontraba en biofilm

multiespecie con *L. gasicomitatum*. No obstante, los valores de recuento total obtenidos mediante DEM en su mayoría corresponden a células no viables, diferentemente a los recuentos obtenidos en el biofilm mixto. Al emplear como técnica analítica el recuento en placa, se observaron aquéllas en estado viable. Es por esta razón que se podría indicar que *P. fragi* es compatible cuando entra en convivencia con *L. gasicomitatum*. Pese a poder compatibilizar su crecimiento, y tal y como se ha discutido anteriormente, hubo una disminución en los recuentos de *P. fragi* después del máximo tiempo de incubación, correspondiente a 72 horas, aunque sin presentar diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0.05$ ) respecto a los anteriores tiempos de incubación. Más estudios serían necesarios para determinar si los recuentos de *P. fragi* seguirían disminuyendo si se aumentara dicho tiempo, tal y como indica la tendencia.



**Figura 9.** Representación del recuento en placa de colonias a las 24, 48 y 72 horas de células recuperadas de biofilms multiespecie de *L. gasicomitatum* y *P. fragi*. Pf (*P. fragi* en biofilm multiespecie), Lg (*L. gasicomitatum* en biofilm multiespecie) y C Lg (control de *L. gasicomitatum* en biofilm monoespecie). Cada valor corresponde a una media de dos repeticiones realizadas en tres días separados ( $n = 6$ ), calculándose a su vez el error estandar de la media. Los valores dentro de una columna que carecen de una letra minúscula común difieren significativamente ( $P < 0,05$ ). Los valores dentro de una fila que carecen de una letra mayúscula común difieren significativamente ( $P < 0,05$ ).

Por otra parte, la interacción estudiada para *L. gasicomitatum* y *L. reuteri* fue distinta a la observada en el anterior caso (**Figura 10**). Tras 24 horas de incubación, la población de *L. gasicomitatum* disminuyó aproximadamente 2 Log (UFC cm<sup>-2</sup>) con respecto a su control, aunque sin presentar diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0.05$ ). Esto podría ser debido a la variabilidad, por lo que se necesitarían un mayor número de muestras para determinar que el efecto inicial es real. Una vez transcurridas las 24 horas de incubación, la curva microbiana de *L. gasicomitatum* coincidía con la curva presentada del biofilm monoespecie, sin diferencias significativas destacables ( $P > 0.05$ ). En este caso, se puede volver a observar la misma tendencia reportada que para los biofilms multiespecie entre *L. gasicomitatum* y *P. fragi*; la población de *L. reuteri* disminuye, esta vez significativamente ( $P < 0.05$ ). Esto podría ser debido a una disminución de nutrientes (Flemming et al., 2016), tal y como se ha discutido anteriormente.



**Figura 10.** Representación del recuento en placa de colonias a las 24, 48 y 72 horas de células recuperadas de biofilms multiespecie de *L. gasicomitatum* y *L. reuteri*. Lr (*P. fragi* en biofilm multiespecie), Lg (*L. gasicomitatum* en biofilm multiespecie) y C Lg (control de *L. gasicomitatum* en biofilm monoespecie). Cada valor corresponde a una media de dos repeticiones realizadas en tres días separados (n=6), calculándose a su vez el error estándar de la media. Los valores dentro de una columna que carecen de una letra minúscula común difieren significativamente ( $P < 0,05$ ). Los valores dentro de una fila que carecen de una letra mayúscula común difieren significativamente ( $P < 0,05$ ).

## 5. CONCLUSIONES

1. *P. fragi* no ha demostrado ser capaz de formar biofilms propios, aun obteniendo recuentos celulares. Este microorganismo se ha adherido débilmente y de forma dispersa, sin generar una estructura definida.
2. *L. reuteri* y *L. gasicomitatum* han mostrado tener la capacidad para formar biofilms con alta densidad celular, dando lugar a una estructura con un entramado complejo y maduro.
3. La tasa de supervivencia de los biofilms monoespecie demostró ser pequeña en todos los casos. No obstante, para el caso de *L. reuteri* y *L. gasicomitatum* se podría atribuir a la técnica analítica empleada, pues el biofilm maduro deposita las células en estado no viable en las capas superiores de la estructura.
4. Respecto a la composición en macromoléculas de la matriz, *L. reuteri* y *L. gasicomitatum* obtuvieron un mayor porcentaje de proteínas, a diferencia de *P. fragi* que el compuesto mayoritario fueron los polisacáridos. El ADN fue el componente minoritario encontrado, excepto para *L. reuteri*.
5. Tanto *P. fragi* como *L. reuteri* pueden sobrevivir y desarrollarse en el interior de la estructura generada en los biofilm de *L. gasicomitatum*, aunque a diferente nivel respecto a cuando se encuentran en biofilms monoespecie.
6. El crecimiento de *L. gasicomitatum* en biofilm maduro no se ve afectado por la presencia de *P. fragi* en ninguno de los tiempos de incubación establecidos. Sin embargo, *L. reuteri* ha demostrado tener algún tipo de efecto en el desplazamiento de *L. gasicomitatum* tras 24 horas en convivencia como biofilm mixto. No obstante, se necesitan más estudios para corroborar dicho efecto.
7. Tanto *P. fragi* como *L. reuteri* presentan una disminución de la población tras 48 horas en coexistencia como biofilm mixto con *L. gasicomitatum*. Se ha determinado que podría ser debido a una disminución en la disponibilidad de nutrientes, dando lugar a competencia y, consecuentemente, muerte celular.



## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez-Gurrea, J. C. (2015). Evolución de la contaminación de superficies durante los procesos productivos en el sector cárnico. *Dialnet plus*.
- Arnaut-Rollier, I., De Zutter, L., Van Hoof, J. (1999). *International Journal of food microbiology*. 48, 87-96.
- Asally, M., Kittisopikul, M., Rue, P., Du, Y., Hu, Z., Catagay, T y Süel, G. M. (2012). Localized cell death focuses mechanical forces during 3D patterning in a biofilm. *Proceedings of the national academy of sciences*, 109(46), 18891-18896.
- Bridier, A., Sanchez-Vizuet, P., Guilbandt, M., Piard, J. C., Naitali, M., y Briandet, R. (2015). Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food microbiology*. 45(PB): 167-178.
- Busalmen, L., Sutherland, I. W. y Jonse, M. V. (1999). The role of exopolysaccharides in dual species biofilm development. *Journal of applied microbiology*. 85: S13-S18.
- Casaburi, A., Piombino, P., Nychas, G. J., Villani, F., Ercolini, D. (2014). Bacterial populations and the volatile associated to meat spoilage. *Food Microbiology*. 45, 83-102.
- Chambless J. D., Hunt S. M., Stewart P. S. (2006). A three-dimensional computer model of four hypothetical mechanisms protecting biofilms from antimicrobials. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 2005–2013. 10.1128/AEM.72.3.2005-2013.2006
- Chmielewski, R. A. N. y Frank, J. F. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 2
- Colagiorgi, A., Di Ciccio, P., Zanardi, E., Ghidini, S y Lanieri, A. (2016). A look inside the *Listeria monocytogenes* biofilms extracellular matrix. *Microorganisms*. 4 (3), 22.
- Colagiorgi, A., Bruini, I., Di Ciccio, P. A., Zanardi, E., Ghidini, S. y Ianieri, A. (2017). *Listeria monocytogenes* biofilms in the wonderland of food industry. *Pathogens*. 6 (3).
- Combrouse, T., Sadovskaya, I., Faille, C., Kol, O., Guérardel, Y. y Midelet-Bpurdin, G. (2013). Quantification of the extracellular matrix of the *Listeria monocytogenes* biofilms of different phylogenetic lineages with optimization of culture conditions. *Journal Appl. Microbiol.* 114 (4), 1120-31.

- Costerton, J. W., Stewart, P. S. y Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 284 (5418): 1318-22.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D. R., y Lappin-Scott H.M., (1995). Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*.49:711-45.
- Desmond, P., Best, J. P., Morgenroth, E., Derlon, N. (2018). Linking composition of extracellular polymeric substances (EPS) to the physical structure and hydraulic resistance of membrane biofilms. *Water research*. 132, 211-221.
- Dominguez Rodriguez, L., Badiola Diez, J. J., Cepeda Sáez, A., Más Barón, A., Rodriguez Ferri, E., Zurera Cosano, G., Tellez Peña, S., (2010). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los biofilms y su repercusión en la seguridad alimentaria.
- Donlan, R. M., y Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15(2): 167-93.
- Doulgeraki, A. I., Ercolini, D., Villani, F. y Nychas, GJ. E. (2012). Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *International journal of food microbiology*. 157(2): 130-141.
- Flemming, H. C., Szewzyk, U., Wingender, J. y Steinberg, P. (2016). Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nature reviewa microbiology*. 14. 563-575.
- Flemming, H. C. y Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature reviews microbiology*.
- Fuster-Valls, N., Marín de Mateo, M., Hernández Herrero, M., Rodriguez Jerez, J. J. (2008). Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless Steel surfaces. *Food control*. 19(3):308-314.
- Garret, T. R., Bhakoo, M. y Zhang, Z. (2008). Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in natural science*. 18. 1049-1056.
- Gómez, J. M. R. (2010). Consecuencias higiénicas de la alteración de los alimentos. *Anales de la real academia nacional de farmacia*.
- González-Rivas, F., Ripolles-Avila, C., Fontecha-Umaña, F., Rios-Castillo, A. G., Rodriguez-Jerez, J. J. (2018). Biofilms in the spotlight: detection, quantification, and removal methods. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 17 (5)
- Gutiérrez, D. Rodriguez-Rubio, L., Martínez, B., Rodríguez, A. y García, P. (2016). Bacteriophages as weapons against bacterial biofilms in the food industry. *Frontiers in Microbiology*. 7: 825.

- Hascöet, A. S. (2019). Desarrollo de biofilms de *Listeria monocytogenes* y microbiota acompañante en instalaciones cárnicas: cuantificación, acción sinérgica y antagonista. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.
- Huang, C. T., Yu, F. P., McFeters, G. A. y Stewart, P. S. (1995). Nonuniform spatial patterns of respiratory activity within biofilms during disinfection. *Applied and environmental microbiology*. 2252-2256.
- Jiménez-Cantero, M., Ripolles-Avila, C., Rodríguez-Jerez, J. J. Biofilms, microorganismos alterantes y deterioro de productos cárnicos. Eurocarne. 277.
- Kang, J., Liu, L., Wu, X., Sun, Y. y Liu, Z. (2018). Effect of thyme essential oil against *Bacillus cereus* planktonic growth and biofilm formation. *Applied microbiology and technology*. 102 (23): 10209-10218.
- Karatan, E. y Watnik, P. (2009). Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Micobiol. Mol. Biol.* 73, 310-347.
- Khelissa, S.O., Adballah, M., Jama, C., Faille, C. y Chihib, N-E. (2017). Bacterial contamination and biofilm formation on abiotic surfaces and strategies to overcome their persistence. *Journal of materials and environmental sciences*. 8 (9), 3326-3346.
- Kretli Winkelstroter, L. (2015). Microbial biofilms: the challenge of food industry. *Biochemistry and molecular biology journal*. 1:1
- Kumar, C. G., Anand, S. K. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International journal of food microbiology*. 42: 9-27.
- Kusumaningrum, H. D., Riboldi, G., Hazeleger, W. C. y Beumer, R. R. (2003). Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *International journal of food microbiology*. 85 (3): 227-36.
- Latham, M. C. (2002). Mejoramiento de la calidad y seguridad de los alimentos. Nutrición humana en el mundo en desarrollo. *Colección FAO: Alimentación y nutrición*. 34(29).
- Lasa, I. y Penadés, J. R. (2006). Bap: a family of Surface proteins involved in biofilm formation. *Research in microbiology*. 157: 99-107.
- López-Macay, A., Fernández-Torres, J. y Zepeda, A. (2016). Principios y aplicaciones de la microscopia láser confocal en la investigación biomédica. *Investigación en discapacidad*. 5 (3), 156-164.

- Martinez-Martinez, L., Pascual, A. y Perea, E. J. (1991). Kinetics of adherence of mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to plastic catheters. *Journal Med. Microbiology*. 34, 7-12.
- Moretro, T. y Langsrud, S. (2017). Residential bacteria on surfaces in the food industry and their implications for food safety and quality. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 16:1022-1041.
- Navia, D. P., Villada, H. S. y Mosquera, S. A. (2010). Las biopelículas en la industria e alimentos. *Rev. Bio. Agro*. 8(2).
- Nerín, C., Aznar, M. y Carrizo, D. (2016). Food contamination during food process. *Trends in food science and technology*. 48: 63-68.
- Nieminen, T. T., Koskinen, K., Laine, P., Hultman, J., Säde, E., Paulin, L., Paloranta, A., Johansson, P., Björkroth, J. y Auvinen, P. (2012). Comparison of microbial communities in marinated and unmarinated broiler meat by metagenomics. *International journal of food microbiology*. 157, 142-149.
- Nieminen, T. T., Vålitalo, H., Säde, E., Paloranta, A., Koskinen, K. y Björkroth, J. (2012). The effect of marination on lactic acid bacteria communities in raw broiler fillet strips. *Frontiers in microbiology*. 3 (376).
- Nouha, K., Saurabh Kumar, R., Balasubramanian, S. y Dayal Tyagi, R. (2018). Critical review of EPS production, synthesis and composition for sludge flocculation. *Journal of environmental sciences*. 66, 225-245.
- Oh, H. S., Tan, C. H., Low, J. H., Rzechowicz, M., Siddiqui, M. F., Winters, H., Kjelleberg, S., Fane, A. G. y Rice, S. A. (2017). Quorum quenching bacteria can be used to inhibit the biofouling of reverse osmosis membranes. *Water research*. 112: 29-37.
- Percival, S. L., McCarty, S. M. y Lipsky, B. (2015). Biofilms and wounds: an overview of the evidence. *Advances in wound care*. 4 (7).
- Peterson, C. P., Sauer, C., y Chatfield, C. H. (2018). The extracellular polymeric substances of *Legionella pneumophila* biofilms contain amyloid structures. *Current microbiology*. 75(6): 1-9
- Philips, C. A. (2016). Bacterial biofilms in food processing environments: a review of recent developments in chemical and biological control. *International Journal of Food Science and Technology*, 51, 1731–1743
- Pontefract, R. D., (1991). Bacterial adherence: its consequences in food processing. *Canadian Institute of food science and technology*. 64: 113-117.

- Pothakos, V., Devlieghere, F., Villani, F., Björkroth, J. y Ercolini, D. (2015). Lactic acid bacteria and their controversial role in fresh meat spoilage. *Meat Science*. 109, 66-74.
- Ranjitkar, S., Lawley, B., Tannock, G. y Engberg, R. M. (2016). Bacterial succession in the broiler gastrointestinal tract. *Applied and environmental microbiology*. 82 (8).
- Ripollés Ávila, C. (2018). Supervivencia de *Listeria monocytogenes* sobre superficies de contact con alimentos: un abordaje multidisciplinar de un problema complejo. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.
- Ripolles-Avila, C., Cervantes-Huaman, B. H., Hascöet, A. S., Yuste, J. y Rodríguez-Jerez, J. J. (2019). Quantification of mature *Listeria monocytogenes* biofilm cells formed by an in vitro model: A comparison of different methods. *International journal of food microbiology*. 289: 209-214.
- Ripolles-Avila, C., Hascöet, A. E., Guerrero-Navarro, A. E. y Rodriguez-Jerez, J. J. (2018). Establishment of incubation conditions to potimize the in vitro formation of mature *Listeria monocytogenes* biofilms on food-contact surfaces. *Food control*. 92: 240-248.
- Ryder, C., Byrd, M. y Wozniak, D. J. (2007). Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Current opinion in microbiology*. 10: 644-648.
- Simoës, M., Simoës, L. C. y Vieira, M. J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT – Food science and technology*. 43, 573-583.
- Srey, S., Jahid, I. K. y Ha, S.D. (2013). Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food control*. 31(2):572-585.
- Sutherland, I. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*. 147: 3-9.
- Sutherland, I. (2001). The biofilm matrix an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in microbiology*. 9(5): 222-7.
- Téllez, S. (2010). Los biofilms y su repercusión en la industria alimentaria. *VISAVET divulgación*.
- Wang, L., Fang, M., Hu, Y., Yang, Y., Yang, M., Chen, Y. (2014). Characterization of the most abundant *Lactobacillus* species in chicken gastrointestinal tract and potential use as probiotics for genetic engineering. *Acta Biochim Biophys Sin*. 46 (7), 612.

- Wang, H., Wang, H., Xing, T., Wu, N., Xu, X., Zhou, G. (2016). Removal of *Salmonella* biofilm from meat processing environment by surfactant in combination with bio-enzyme. *LWT – Food Science and Technology*. 66: 298-304.
- Whitchurch, J., Neu, T., Flemming, H. C. (1999). Microbial extracellular polymeric substances. 1-19 (Springer, Heidelberg).
- Wingender, J., Neu, T. y Flemming, H. C. (1999). Microbial extracellular polymeric substances. 1-19 (Springer, Heidelberg).
- Yuste, R. (2005). Fluorescence microscopy today. *Nature Methods, Published Online*: 2(12), 902.
- Zetzmann, M., Okshevsky, M., Enderes, J., Sedlag, A., Caccia, N., Auchter, M. y Riedel, C. U. (2015). DNase-sensitive and resistance mutants of biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *Frontiers in microbiology*. 6(DEC): 1-11.
- Zeithaml, V. A. (1988). Consumer perceptions of price, quality and value: a means-end model and synthesis of evidence. *Journal of marketing*. 52(3): 2-22.
- BacDive, Braunschweig, Alemania, recuperado de <https://bacdive.dsmz.de/>